Merrifield-Synthesen variierter Insulin-A-Ketten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HEINZ GROSSMANN

aus Heilbronn

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0080

Merrifield-Synthesen variierter Insulin-A-Ketten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HEINZ GROSSMANN

aus Heilbronn

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 1970

Dekan: Professor Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter: Dozent Dr. Dr. W. Frank

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. G. Weitzel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für das Thema und für die Unterstützung bei dessen Bearbeitung.

Herrn Dr. S. Hörnle, Herrn Dr. U. Weber sowie meinen Laborkollegen bin ich für wertvolle Ratschläge und vielfache Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Der analytischen Abteilung des Instituts unter Leitung von Frau Dr. A.-M. Fretzdorff danke ich für die Ausführung der Analysen.

Frau E. Hofmann sei für ihre Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche gedankt.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2.	Material und Methoden	
2.1.	Abkürzungen	4
2.2.	Ausgangsprodukte und Geräte	5
2.3.	Analytische Methoden	7
2.4.	Präparation der S-Sulfonat-Ketten des Rinderinsulins	8
2.5.	Darstellung der Ausgangsprodukte zur MERRIFIELD-Synthese	9
2.6.	MERRIFIELD-Synthese der A-Ketten	19
2.7.	Abspaltung der Schwefel-Schutzgruppen	23
2.8.	Gelfiltration an Sephadex G-25	24
2.9.	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex	25
2.10.	Rekombination der A-Ketten mit natürlicher Rinder-B-Kette zu Hybridinsulinen	26
2.11.	Biologische Testung der Hybridinsuline	27
3.	Ergebnisse	
3.1.	Synthese einer Rinder-A-Kette unter Verfolgung des Umsatzes	30
3.2.	Vergleichende Synthesen einiger [Ala^{12}]-Schaf-A-Ketten	30
3.3.	Versuche zur Reinigung der synthetischen A-Ketten	34
3.4.	Variation der Kettenlänge	38
3.5.	Variationen im intrachenaren Ring	39
3.6.	Variationen unter Weglassung der intrachenaren Disulfidbrücke	41
3.7.	Aminosäureanalysen	43
4.	Diskussion	
4.1.	Syntheseverlauf und Kettenreinigung	46
4.2.	Vergleich der Synthesebedingungen	48
4.3.	Variation der Kettenlänge	50
4.4.	Variationen im intrachenaren Ring	51
4.5.	Bedeutung der intrachenaren Disulfidbrücke	53
5.	Zusammenfassung	55
6.	Literaturverzeichnis	56

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Da die Möglichkeiten chemischer Abwandlungen am nativen Gesamtmolekül des Insulins (s. Abb.1) begrenzt sind, versuchte die Arbeitsgruppe um WEITZEL, die Frage der Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung des Insulins durch Synthese sequenzvariierter Insulin-A-Ketten anzugehen, die zur Ermittlung der biologischen Aktivität mit natürlicher B-Kette zu Hybridinsulinen rekombiniert wurden[1-5]. Die ersten Ketten wurden in klassischer Weise durch Fragmentkondensation aufgebaut. Nach dem Aufkommen der Peptidsynthese am Festkörper nach MERRIFIELD[6-10] und den ersten Synthesen der Insulinketten nach diesem Verfahren[11,12] begann die Arbeitsgruppe, ihre Varianten mit dieser Methode herzustellen. Die Vorteile der Festkörpersynthese liegen in ihrem relativ geringen Material- und Zeitaufwand und in den guten Ausbeuten. Das Verfahren erlaubt aber keine Zwischenreinigungsschritte; deshalb können die durch unvollständige Kupplung entstehenden Fehlsequenzen nicht sofort entfernt werden, sondern potenzieren sich bis zum Ende der Synthese[13,14]. Das Endprodukt ist dann mit einer ganzen Reihe von Peptiden ähnlicher Sequenz verunreinigt. Dazu kommen noch Schädigungen, die die fertig synthetisierten Ketten bei der Abspaltung der Schutzgruppen erfahren[15,16].

Die biologische Aktivität der so erhaltenen Hybridinsuline lag bei 1-2%, bezogen auf natürliches Rinderinsulin. Diese geringen Aktivitäten lassen keine genauen Aussagen darüber zu, ob das erhaltene sequenzvariierte Hybridinsulin bei totaler Reinigung noch voll aktiv sein würde. Ungeklärt ist auch, ob die zahlreichen Verunreinigungen der rohen Kettenprodukte die Wirkung der Hybridinsuline beeinflussen.

Die erste Aufgabe dieser Arbeit ist es deshalb, die MERRIFIELD-Synthese der A-Kette in ihren einzelnen Schritten genau zu studieren; dazu soll eine Rinder-A-Kette unter fortlaufender analytischer Verfolgung her-

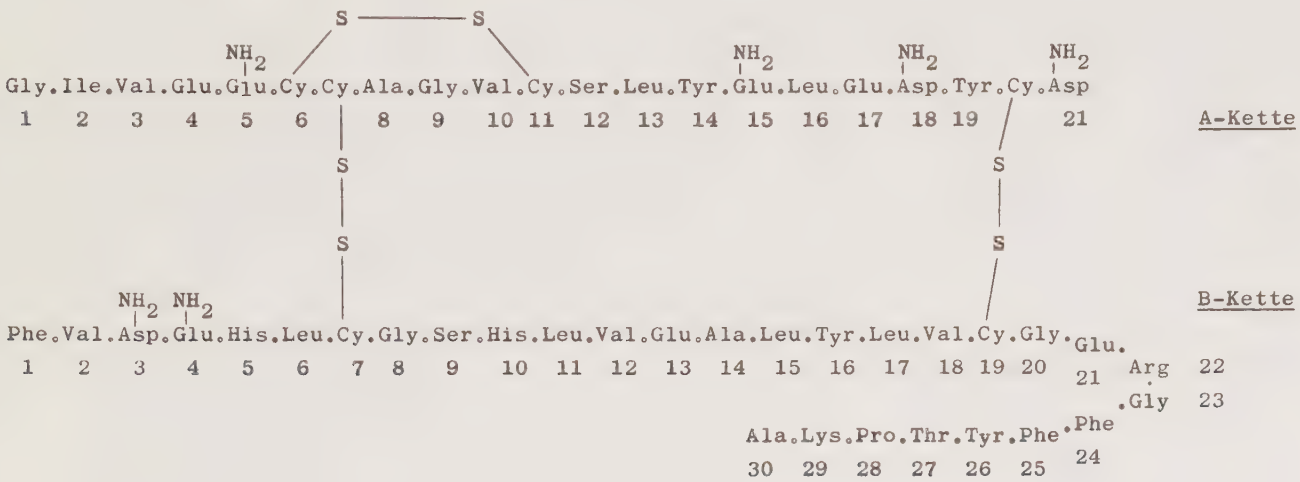


Abb. 1: Formel des Schafinsulins

gestellt werden. Die dabei gewonnenen Erfahrungen sollen auf die Synthese einer einfachen, variierten Kette, der [Ala^{12}]Schaf-A-Kette, angewandt werden. Am Modell dieser voll aktiven Variante[1)] soll die Synthese durch Darstellung mehrerer solcher Ketten unter Änderung der Synthesebedingungen (Harz, Beladung, Konzentration, Reaktionsdauer, Schwefelschutzgruppen) weiter untersucht werden. Deren Vergleich soll zeigen, unter welchen Bedingungen die Synthese am besten verläuft und ob eine Erhöhung der Aktivitäten zu erzielen ist. Weiterhin soll untersucht werden, ob und in welchem Umfang sich die erhaltenen Kettenprodukte reinigen lassen.

Die zweite Aufgabe der Arbeit besteht darin, die Ergebnisse auf die Synthese einiger sequenzvariierter Insulin-A-Ketten anzuwenden. Diese sollen als Beitrag zur Untersuchung der noch ziemlich unbekannten Funktion folgender Strukturelemente der A-Kette dienen:

a) Kettenlänge: Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen kann man weder das aminoendständige Glycin[1)] noch das Asparagin am Carboxylende [17,18)] weglassen, ohne daß ein fast vollkommener Aktivitätsverlust eintritt. Untersucht werden soll, ob die Kette noch wirksam ist, wenn eine Aminosäure in der Mitte weggelassen wird.

Anhand einer N-Acetyl-A-Kette soll geprüft werden, ob sich ältere, am Gesamtinsulinmolekül erhaltene Ergebnisse[19)] mit anderer Methodik bestätigen lassen; danach sollte eine Verlängerung der A-Kette durch den Acetylrest die Insulinaktivität nicht mindern.

b) Aminosäuresequenz im intrachenaren Ring: Die Positionen 8-10 der A-Kette zeigen bei den verschiedenen Tierspezies große Unterschiede. Dies scheint darauf hinzuweisen, daß der Aminosäuresequenz im intrachenaren Ring keine besondere Bedeutung für die Wirkung des Insulins zukommt. Durch vereinfachenden Austausch dieser Aminosäuren soll untersucht werden, ob überhaupt eine bestimmte Sequenz in diesen Positionen notwendig ist.

c) Intrachenarer Ring: Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die intrachenare Disulfidgruppe am Wirkungsmechanismus des Insulins nicht wesentlich betei-

ligt ist[20]. Dagegen dürfte sie für die Aufrechterhaltung einer bestimmten A-Ketten-Konformation wichtig sein, denn das Fehlen der Brücke erbringt einen starken Aktivitätsabfall des synthetischen Hybridinsulins[3]. Es soll untersucht werden, ob sich die fehlende, kettenkontrahierende Funktion der Brücke dadurch ausgleichen läßt, daß die A-Kette in ihrer Mitte verkürzt und somit wieder auf ihre normale Länge gebracht wird.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

Die Abkürzungen und Symbole der Aminosäuren, Peptide und ihrer Derivate richten sich nach den von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln (siehe J.biol.Chemistry 241, 2491 (1966)
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 348, 256 (1967)).
Darüber hinaus wurden folgende Abkürzungen verwendet:

$ASSO_3^-$ = S-Sulfonatform
ASH, AS^- = reduzierte Form) der Insulin-A-Kette
$BSSO_3^-$ = S-Sulfonatform der Insulin-B-Kette
Wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, meinen die Ausdrücke A-Kette und B-Kette die Ketten in ihrer S-Sulfonatform.

Boc- = N-tert.-Butyloxycarbonyl-
Bzl- = Benzyl-
DCCI = N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA = Dicyclohexylamin
DMF = Dimethylformamid
Et_3N = Triäthylamin
EtOH = Äthanol
HOAc = Essigsäure
-ONp = p-Nitrophenoxy (p-Nitrophenylester)
SÄM- = S-Äthylmercapto-
SBM- = S-Benzylmercapto-
TFA = Trifluoressigsäure
THF = Tetrahydrofuran
Tris = Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan

2.2. Ausgangsprodukte und Geräte

2.2.1. Chemikalien und Hilfsstoffe:

L-Aminosäuren: wurden in der von den Firmen Merck, Ajinomoto und Diamalt gelieferten Reinheit benützt.

Benzylbromid: purum; Fa. Fluka AG, Buchs

t-Butyloxycarbonyl-hydrazid: zur Synthese; Fa. Merck AG, Darmstadt

Chlormethylmethylather: ≙ 85%; Fa. Schuchardt, München

DEAE-Sephadex: Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt

Dialysierschlauch: Visking-Dialysierschlauch Typ 20/32; Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg

Diäthyldisulfid: Fa. EGA-Chemie KG, Steinheim

Dicyclohexylcarbodiimid: zur Synthese; Merck

Dowex 50 WX 2: 200-400 mesh, p.a.; Serva

Dünnschicht-Chromatographie-Folien: Kieselgel S-HR/UV_{254}; Fa. Macherey-Nagel & Co, Düren

Elektrophoresepapier: Nr. 2043b mgl.; Fa. Schleicher & Schüll

Insulin: Kristallines Rinderinsulin der Fa. Hoechst AG; 27,0 I.E./mg, Zinkgehalt ~0,3%

2-Mercaptoäthanol: puriss. p.a.; Fluka

Merrifield-Polymer: Copolymer aus 98% Styrol + 2% Divinylbenzol 200-400 mesh; Fluka

Natriumtetrathionat: wurde nach Gmelin-Kraut, Handbuch der anorg. Chemie, 7. Aufl., Bd.II,1 S.341 hergestellt. Lagerung bei - 15°.

p-Nitrophenol: Das technische Produkt wurde durch zweimaliges Umkristallisieren aus 5%iger HCl unter Zusatz von Aktivkohle gereinigt.

Pyridinhydrochlorid: purum; Fluka

Sephadex G-25 fine und coarse; Deutsche Pharmacia

Triäthylamin: wurde über KOH getrocknet und anschließend destilliert.

Trifluoressigsäure: zur Synthese; Merck

Die komprimierten Gase (Ammoniak, Bromwasserstoff, Chlorwasserstoff und Stickstoff) wurden Stahlflaschen entnommen und waren von ungefähr 99%iger Reinheit.

Falls erforderlich, wurden die Lösungsmittel vor Gebrauch destilliert; das Absolutieren erfolgte nach den üblichen Verfahren. Dimethylformamid wurde durch azeotrope Destillation eines ternären Gemisches aus DMF/Benzol/Wasser 85:15:4 gereinigt. War eine besondere Reinheit der Lösungsmittel nicht nötig, so wurden diese im techn. Zustand verwendet. Alle anderen, in der Arbeit verwendeten und hier nicht aufgeführten Substanzen waren analysenrein und wurden von den Firmen Merck und Riedel-de Haën bezogen.

2.2.2. Geräte

Aminosäureanalysator	: Unichrom Amino Acid Analyzer; Fa. Beckman Instruments GmbH, München
Elektrophorese-Gerät	: SHANDON-Elektrophorese-Apparatur; Fa. Shandon Scientific Comp. Ltd., London
Fraktionssammler und Durchflußphotometer	: LKB B"RadiRac" und Uvicord II; Fa. LKB Producter AB, Stockholm
Mikrowaage:	Mikrowaage M5; Fa. E. Mettler, Zürich
pH-Stat:	pH-Meter 22, Einstab-Glaselektrode GK 2021B, Magnetventil MNV 1c; Fa. Radiometer, Copenhagen
Photometer:	Spektralphotometer PMQ II; Fa. C.Zeiss, Oberkochen
Potentiometer:	pH-Meter 26, Ag/AgCl-Elektrode; Fa. Radiometer, Copenhagen
Schmelzpunktbestimmungsapparat	: Apparat nach Tottoli; Fa. Büchi, Flawil (die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert)

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. Dünnschichtchromatographie:

Diese wurde auf Kieselgel-Kunststoff-Folien durchgeführt. Als Laufmittel dienten:
Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1
Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24
Spruhreagenz: 0,1 %ige Lösung von Ninhydrin in wassergesättigtem Butanol. Auch Boc-Aminosäuren werden mit Ninhydrin angefärbt, da die Schutzgruppe beim Erhitzen durch die noch vorhandene Essigsäure des Laufmittels zum Teil abgespalten wird.

2.3.2. Papierelektrophorese:

Die Elektrophorese wurde auf Chromatographiepapier Nr. 2043b in einer SHANDON-Kammer durchgeführt. Ca. 200 µg Peptid wurden in Puffer gelöst auf das trockene Papier aufgetragen. Laufzeit: 8 Stunden bei 200 Volt (10 Volt/cm). Puffer 10% Essigsäure (w/v), 15% Ameisensäure, 4 M Harnstoff. Die Elektropherogramme wurden nach gutem Trocknen im Heißluftstrom mit Pauly-Reagenz entwickelt[21].

2.3.3. Quantitative Aminosäurebestimmung:

Etwa 2 mg Peptid wurden zusammen mit 2 ml konz. HCl p.a. und 2 ml bidest. Wasser in ein Hydrolysenrohr gegeben und die Lösung gut mit Stickstoff begast. Das zugeschmolzene Rohr wurde für 24 Stunden im Ölbad auf 110° erwärmt, danach das Hydrolysat im Vakuum zur Trockene eingeengt und uber KOH/P_2O_5 getrocknet. Die Aminosäuren des so erhaltenen Hydrolysats wurden dann im Aminosäureanalysator quantitativ bestimmt.

2.3.4. Chloridbestimmung:

Chlorid wurde potentiometrisch bestimmt[22]. Wässrigen Lösungen wurde etwa 70% DMF zugesetzt, um den Umschlagspunkt deutlicher zu erkennen. Die Lösungen wurden mit chloridfreier HNO_3 auf pH 4-5 gebracht und mit N/100 $AgNO_3$-

Lösung titriert. Mit dieser Methode konnten auch noch 0,03 - 0,05 mMol Cl^- exakt bestimmt werden.

2.4. Präparation der S-Sulfonatketten des Rinderinsulins

Rinderinsulin wurde nach DU et al.[23,24] durch oxydative Sulfitolyse gespalten: 2,0 g kristallines Insulin wurden in 80 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4 und 4 M an Harnstoff) gelöst. Nach Zugabe von 2,8 g Na_2SO_3 und 1,4 g Natriumtetrathionat wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 6 Stunden lang gegen dest. Wasser unter Rühren und häufigem Wasserwechsel dialysiert. Das trübe Dialysat wurde mit verdünnter Essigsäure auf pH 6,0 gebracht und die gallertig ausgefallene B-Kette abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die A-Kette und wurde lyophilisiert.

Die so erhaltenen Kettenpräparate waren noch miteinander verunreinigt und wurden nach NIU et al.[58] über den Kationenaustauscher Dowex 50 WX 2 gereinigt: Die A-Kette wurde in wenig Start-Puffer (2,6 M an Ameisensäure und 8 M an Harnstoff) gelöst auf eine Säule (1,5 x 25 cm), die den Austauscher in seiner H^+-Form und in dem selben Puffer äquilibriert enthielt, aufgetragen. Während die positiv geladenen Verunreinigungen festgehalten wurden, lief die stark saure A-Kette mit diesem Puffer durch und wurde nach kurzer Dialyse und anschließender Entsalzung über Sephadex G-25 coarse gefriergetrocknet. Ausbeute nach Trocknen im Vakuum über P_2O_5: 634 mg (= 76% d.Th.).

Die B-Kette, unter den selben Bedingungen aufgetragen, wurde vom Austauscher festgehalten. Nachdem die Säule mit dem sauren Startpuffer gut durchgespült worden war, wurde die B-Kette mit einem Gradienten des Startpuffers gegen einen Puffer, der 1 M an NH_3 und 8 M an Harnstoff war, eluiert. Die Fraktion der B-Kette wurde bei pH 5,1 ausgewaschen. Nach Dialyse wurde die ausgefallene Kette mit verd. NH_3 in Lösung gebracht, nochmals mit verd. Essigsäure bei pH 6,0 ausgefällt, abzentrifugiert, in wenig Wasser mit verd. NH_3 gelöst und gefriergetrocknet. Ausbeute nach Trocknen über P_2O_5: 630 mg (= 56% d.Th.).

Elektrophoretisch war in diesen Kettenpräparaten nicht mehr Insulin oder die andere Kette nachzuweisen. Die A-Kette zeigte noch zwei schwache, weiter anodisch liegende Banden als Verunreinigung, die B-Kette zwei schwache Nebenbanden, die weniger weit der Kathode zu lagen.
Im Mäusefalltest zeigten die beiden Ketten praktisch keine Insulinaktivität mehr: Die B-Kette hatte unter 0,01% und die A-Kette, nach Rekombination mit sich selbst, unter 0,03% Aktivität (bezogen auf Proteineinwage, Rinderinsulin = 100%).
Aminosäureanalysen der Kettenpräparate siehe unter 3.7.

2.5. Darstellung der Ausgangsprodukte zur Merrifield-Synthese

2.5.1. Vorstufen der Boc-Aminosäuren

Boc-Azid[25]:

300 g (2,25 Mol) Boc-Hydrazid wurden in 175 ml Wasser und 254 g Eisessig gelöst. Unter Kühlung im Eis-Kochsalz-Bad und unter starkem Rühren wurde eine Lösung von 172,2 g $NaNO_2$ in 200 ml Wasser so zugetropft, daß die Temperatur des Reaktionsgemisches zwischen +5 und +10° blieb. Nach je 1stdg. Ruhren unter Kühlung und bei Raumtemperatur wurden 375 ml Wasser und 200 ml Äther zugegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde noch dreimal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden mit Wasser, mit 1N $NaHCO_3$-Lösung, bis diese braun-rot gefärbt wurde, und nochmals mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und der Äther im Vakuum bei 10° bis zur Gewichtskonstanz abgezogen.
Ausbeute: 295 g (= 91% d.Th.) Mol.-Gew.: 143,2
Die leicht gelbliche Flüssigkeit wurde wegen der Explosionsgefahr nicht destilliert, sondern gleich als ~4 M Lösung in Dioxan weiterverarbeitet.

S-Äthylmercapto-Cystein:

a) Perbenzoesäure[26]: Zu einer Lösung von 10,4 g Natrium in 200 ml abs. Methanol ließ man unter Ruhren und Kühlung eine Lösung von 100 g Benzoylperoxyd in 200 ml Chloroform zutropfen und achtete darauf, daß die Tempe-

ratur nicht über 0° stieg. Nach Beendigung der Reaktion wurde die entstandene Suspension auf 700 ml eishaltiges Wasser gegossen; das Na-Perbenzoat ging dabei in die wässrige Phase. Die Chloroformphase wurde noch zweimal mit Eiswasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Auszüge unter Kuhlung mit 450 ml 1N H_2SO_4 angesäuert. Die angefallene Perbenzoesäure wurde mehrmals mit Chloroform extrahiert, die Chloroformauszüge mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer auf 250 ml eingeengt.

b) Diäthylthiosulfinat[27]: Zu einer Lösung von 40 g (320 mMol) Diäthyldisulfid in 250 ml Chloroform wurde unter starker Kühlung und Rühren die oben erhaltene Perbenzoesäurelösung so zugetropft, daß die Temperatur bei 0° blieb. Nach je einstündigem Rühren bei 0° und Raumtemperatur wurden 200 ml 1N $NaHCO_3$-Lösung zugegeben, um die nicht umgesetzte Perbenzoesäure zu entfernen. Die Chloroformphase wurde noch mehrmals mit verd. Bicarbonatlösung ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedämpft.

c) S-Äthylmercapto-cystein[28,29]: 24,3 g (200 mMol) Cystein wurden in einer äquivalenten Menge 1 N HCl gelöst und das Diäthylthiosulfinat in wenig Äthanol gelöst zugegeben. Der pH des Reaktionsgemisches wurde nun vorsichtig mit 2 N NaOH auf 6,5 eingestellt. Nach Abkuhlen wurde das ausgefallene SÄM-Cystein abgesaugt, mit Äthanol und Äther gewaschen und aus kochendem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 20-30 g (55 - 82% d.Th.) Mol.-Gew.: 181,0
Schmp.: 205-208° (Zers.) (Lit.: 206-208°)
$[\alpha]_D^{25}$ = - 148,3° (c = 0,3; 1 N HCl) (Lit.: -146°)

S-Benzyl-cystein[30]:

72,6 g (0,6 Mol) Cystein wurden in 270 ml 2 N NaOH und 450 ml Äthanol gelöst und unter Rühren 113 g Benzylbromid langsam zugetropft. Nach mehrstündigem Stehen bei 0° wurde das ausgefallene SBzl-Cys abgesaugt, mit Wasser,

Äthanol und Äther gewaschen und aus kochendem Wasser umkristallisiert.
Ausbeute: 100 g (79% d.Th.) Mol.-Gew.: 211,4
Schmp.: 212° (Lit.: 211°)

Glutaminsäure-γ-benzylester[31]:
Zu 500 ml abs. Äther wurden unter Eiskuhlung langsam 50 ml konz. H_2SO_4 p.a. zugetropft, dann 500 ml dest. Benzylalkohol zugefugt und der Äther im Vakuum abgezogen. Zu dem öligen Produkt wurden 73,5 g (0,5 Mol) Glutaminsäure in kleinen Mengen zugegeben und 20 Std. gerührt. Glu-γ-OBzl kristallisierte nach Zugabe von 1 l Äthanol (96%ig) und 250 ml dest. Pyridin aus, wurde nach längerem Stehen im Kalten abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen und aus kochendem Wasser umkristallisiert.
Ausbeute: 50-75 g (40-64% d.Th.) Mol.-Gew.: 237,3
Schmp.: 185° (Lit.: 186-189°)
$[\alpha]_D^{25}$ = +27,7° (c = 2,5; 1 N HCl) (Lit.: +27,7°)

O-Benzyl-serin:
O-Benzyl-DL-serin wurde nach[32,33] aus Acrylsäureäthylester aufgebaut. Von dem acetylierten Racemat[34] wurde mit Aminoacylase I (E.C. 3.5.1.b) der Acetylrest der L-Verbindung abgespalten[35].
Ein einfacherer Weg zur Darstellung von Boc-OBzl-Ser wurde erst nach Abschluß der Arbeit in der Literatur beschrieben[36].

O-Benzyl-tyrosin[37]:
145 g (0,8 Mol) Tyrosin wurden in 400 ml 2 N NaOH suspendiert, 100 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in 250 ml Wasser zugegeben, nach 1/2 stdg. Rühren der ausgefallene Tyrosin-Kupfer-Komplex mit 3 l Methanol und 400 ml 2 N NaOH in Lösung gebracht und vom Ungelösten abzentrifugiert. Nach Zugabe von 100 ml Benzylbromid wurde 1 Std. gerührt, der blaue Niederschlag abgesaugt, gut mit Wasser/Methanol (3,5:1) gewaschen und an der Luft getrocknet. Der Kupfer-Komplex wurde durch mehrmaliges Zerreiben mit 1 N HCl zerstört und gründlich mit Wasser, verd. NH_3, Wasser,

Aceton und Äther gewaschen. Umkristallisation aus 80%iger Essigsäure.
Ausbeute: 72 g (= 33% d.Th.) Mol.-Gew.: 271,3
Schmp.: 220-223° (Lit.: 223°)
$[\alpha]_D^{25} = -10,0°$ (c = 1; 80%ige HOAc) (Lit.: -9,9°)

2.5.2. Boc-Aminosäuren

Die Boc-Aminosäuren wurden (bis auf die Verbindung des SAM-Cysteins) nach der von SCHNABEL beschriebenen pH-Stat-Methode hergestellt[38].
Allgemeine Arbeitsvorschrift: 500 mMol Aminosäure (wenn nötig mit geschützten Seitengruppen) wurden in 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert, 140 ml (550 mMol) einer 4 M Boc-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und am Autotitrator bei dem für die Aminosäure am günstigsten pH unter starkem Rühren mit 4 N NaOH titriert. Nach Verbrauch der stöchiometrischen Menge NaOH (250 ml) wurde die nunmehr klare Lösung im Vakuum bei 35° auf 200-300 ml eingeengt und dreimal mit 100 ml Äther extrahiert. Die Boc-Aminosäure wurde nun aus ihrem Na-Salz freigesetzt, indem man die auf 0° abgekuhlte wässrige Phase langsam und unter Rühren in eine kalte, gesättigte Citronensäurelösung goß.
Fiel die Boc-Aminosäure dabei in fester Form aus (Boc-Asn, Boc-S-Bzl-Cys, Boc-Leu, Boc-O-Bzl-Tyr), so wurde sie abfiltriert, gut mit kaltem Wasser gewaschen und entweder gleich umkristallisiert (Boc-Asn, Boc-Leu) oder in Essigester aufgenommen und wie die als Öl ausgefallenen Boc-Aminosäuren weiterbehandelt.
Bei diesen wurde die wässrige Lösung mit Kochsalz gesättigt und dann dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterauszüge wurden sechsmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet. Der Essigester wurde dann im Vakuum bei 35° abgezogen, die als Öl zurückbleibende Boc-Aminosäure in einem geeigneten Lösungsmittelgemisch zur Kristallisation gebracht und mehrmals umkristallisiert. Die Reinheit der Produkte wurde dünnschichtchromatographisch überprüft.

Boc-Ala:

Titrations-pH: 10,1	Umkristallisation aus Äther/Petroläther
Ausbeute: 90%	Mol.-Gew.: 189,2
Schmp.: 79-81°	(Lit.: 80-82°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -12,2° (c = 1; Dioxan)	(Lit.: 12,5°)

Boc-Asn:

Titrations-pH: 9,8	Umkristallisation aus Äthanol/Wasser (1:4)
Ausbeute: 48%	Mol.-Gew.: 232,3
Schmp.:173-174°	(Lit.: 174-176°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -7,4° (c=1; DMF)	(Lit.: -8,5°)

Boc-SBzl-Cys:

Titrations-pH: 9,6	Umkristallisation aus Äther/Petroläther
Ausbeute: 80%	Mol.-Gew.: 311,4
Schmp.: 86-87°	(Lit.: 63-65°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -45,5° (c=1;HOAc)	(Lit.: -45,3°)

Boc-Gln:

Titrations-pH: 10,3	Umkristallisation aus Essigester
Ausbeute: 50%	Mol.-Gew.: 246,3
Schmp.:115-117°	(Lit.: 116-118°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -2,7° (c=1; EtOH)	(Lit.: -2,9°)

Boc-Glu-γ-OBzl:

Titrations-pH: 9,5	Das Produkt war nicht kristallin zu erhalten, sondern fiel als Öl an.

Ausbeute an sirupösem Rohprodukt: 54%

Zur Herstellung des p-Nitrophenylesters wurde dieses Rohprodukt eingesetzt. Ansonsten wurde über das DCHA-Salz gereinigt: 90 g (270 mMol) Öl wurden in 200 ml Äther gelöst und unter Eiskühlung 58,5 g (324 mMol) DCHA zugege-

ben. Durch Zugabe von Petroläther wurde das DCHA-Salz ausgefällt, abgesaugt, Mit Petroläther gewaschen und aus Aceton, das wenig Äthanol enthielt, umkristallisiert.

Ausbeute: 114 g
(80% bezogen auf das Rohöl) Mol.-Gew.: 518,7
Schmp.: 138-139° (Lit.: 140-142° [39])

Boc-Glu-γ-OBzl wurde folgendermaßen wieder freigesetzt: 114 g DCHA-Salz wurden in 1 l Essigester suspendiert und mit 500 ml gesättigter Citronensäurelösung bis zum Entstehen einer klaren Lösung geschüttelt. Nach zweimaligem zusätzlichem Extrahieren der wässrigen Phase mit Essigester wurden die vereinigten Essigesterauszüge 8 mal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Essigesterphase wurde dann über $MgSO_4$ unter Zugabe von Aktivkohle getrocknet und der Essigester am Rotationsverdampfer abgezogen. Das zurückbleibende Öl wurde in Methylenchlorid aufgenommen und Boc-Glu-γ-OBzl als 1 M Maßlösung eingesetzt.

Boc-Gly:

Titrations-pH: 10,0 Umkristallisation aus Essigester/Petroläther
Ausbeute: 70% Mol.-Gew.: 175,0
Schmp.: 87-88° und 94-95° (je nach Modifikation) (Lit.: 94-95°)

Boc-Ile:

Titrations-pH: 9,8 Umkristallisation aus Petroläther
Ausbeute: 85% Mol.-Gew.: 231,3
Schmp.: 68-70° (Lit.: 66-68°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = +2,5° (c=1; HOAc) (Lit.: +2,5°)

Boc-Leu·1/2 H_2O:

Titrations-pH: 9,7 Umkristallisation aus THF/Petroläther
Ausbeute: 84% Mol.-Gew.: 240,3
Schmp.: 77-81° (Lit.: 78-81°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -26,5° (c=1; HOAc) (Lit.: -30,0°)

Boc-Phe:

Titrations-pH: 10,1	Umkristallisation aus Äther/Petroläther
Ausbeute: 90%	Mol.-Gew.: 265,0
Schmp.: 84-86°	(Lit.: 84-86°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -4,0° (c=1; HOAc)	(Lit.: -4,0°)

Boc-OBzl-Ser:

Titrations-pH: 9,5	Umkristallisation aus Essigester/Petroläther
Ausbeute: 60%	Mol.-Gew.: 263,2
Schmp.: 58-60°	(Lit.: 54-63°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ =+35,0° (c=1; THF)	

Boc-OBzl-Tyr:

Titrations-pH: 10,4	Umkristallisation aus Essigester/Petroläther
Ausbeute: 81%	Mol.-Gew.: 371,4
Schmp.: 108-110°	(Lit.: 108-110°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ =+12,4° (c=1; Aceton)	(Lit.: + 12,1°)

Boc-Val:

Titrations-pH: 9,5	Umkristallisation aus Äther/Petroläther
Ausbeute: 84%	Mol.-Gew.: 217,3
Schmp.: 77-79°	(Lit.: 72-73° u. 77-79°)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -6,5° (c=1; HOAc)	(Lit.: -6,0°)

Boc-Thr und N-Boc-N^{i}-Bzl-His wurden freundlicherweise von Herrn Diplom-Biochemiker K. Eisele überlassen.

Boc-SÄM-Cys[29]:

Wurde nicht nach der pH-Stat-Methode hergestellt, da bei dem relativ stark alkalischen pH, bei dem dort gearbeitet wird, die Gefahr des Disulfidaustausches zu groß ist. Es wurde deshalb Triäthylamin als Base verwendet. 45 g (250 mMol) SÄM-Cystein, 500 ml Wasser, 700 ml Dioxan, 105 ml Triäthylamin und 100 ml (330 mMol) 4 M Boc-Azid-

Lösung in Dioxan wurden unter Rühren für 20 Std. auf 45° erwärmt. Nach Einengen des Reaktionsgemisches auf etwa 300 ml wurde dreimal mit Äther extrahiert und unter Kühlung mit fester Citronensäure auf pH 2-3 angesäuert. Das sich dabei abscheidende ölige Produkt wurde mit Essigester extrahiert, die Essigesterextrakte achtmal mit gesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt, über $MgSO_4$ und Aktivkohle getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 ml Äther gelöst, 45 g (250 mMol) DCHA zugegeben und das DCHA-Salz durch Zugabe von Petroläther zur Kristallisation gebracht. Umkristallisieren aus Aceton unter Zusatz von ganz wenig Äthanol.

Ausbeute: 95 g (82% d.Th.) Mol.-Gew.: 462,7

Schmp.: 137-138° (Lit.: 137-138°)

Das DCHA-Salz wurde in Essigester suspendiert und bis zu seiner Lösung mit gesättigter Citronensäurelösung geschüttelt. Die wässrige Phase wurde noch dreimal mit Essigester extrahiert und die vereinigten Essigesterphasen mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen. Nach Trocknen über $MgSO_4$ und Aktivkohle wurde auf 100 - 200 ml eingeengt, bis zur Trübung Petroläther zugegeben und auf 0° abgekühlt. Das sich dabei abscheidende Öl wurde verworfen (vermutlich Di-Boc-Cystin), der Überstand durch eine Schicht Aktivkohle filtriert und im Vakuum eingedampft. Das zurückbleibende Öl wurde mit Petroläther überschichtet und kristallisierte nach Zugabe von Impfkristallen durch.

Ausbeute: 33 g (47% d.Th. bezog. auf SÄM-Cys)

Mol.-Gew.: 281,4

Schmp.: 70-71° (Lit.: 71-73°)

$[\alpha]_D^{25}$ = -102,0° (c=2; Methanol) (Lit.: -104°)

Boc-SBM-Cys[40] wurde freundlicherweise von Herrn Diplom-Biochemiker P. Hartter zur Verfügung gestellt.

2.5.3. Boc-Aminosäuren-p-Nitrophenylester:

Boc-Asn-ONp[41]:

56 g (240 mMol) Boc-Asn und 37,6 g (264 mMol) p-Nitro-

phenol wurden in 500 ml abs. THF und 180 ml abs. DMF gelöst, bei 0° 51,5 g (250 mMol) DCCI in 100 ml THF zugegeben und unter Eiskuhlung 6 Std. lang gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, mit THF nachgewaschen und das THF im Vakuum abgezogen; die zuruckbleibende DMF-Lösung wurde filtriert, mit 500 ml Essigester versetzt, mit verd. $NaHCO_3$-Lösung, Wasser, verd. Citronensäurelösung und nochmals Wasser ausgeschüttelt und über Na_2SO_4 getrocknet. Die verbleibende Essigesterlösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand zweimal aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 26,8 g (= 32% d.Th.) Mol.-Gew.: 353,2
Schmp.: 153-154° (Lit.: 157-158°)
$[\alpha]_D^{25}$ = -37,8° (c=1; DMF) (Lit.: -45,3°)

Boc-Gln-ONp[42]:

49,3 g (200 mMol) Boc-Gln und 30,6 g (220 mMol) p-Nitrophenol wurden in 150 ml abs. THF gelöst, auf -20° abgekühlt, 41 g (200 mMol) DCCI in wenig THF langsam zugegeben und über Nacht bei 0° gerührt. Dann wurde vom ausgefallenen Harnstoff abfiltriert, mehrmals mit heißem THF nachgewaschen, das THF im Vakuum abgezogen und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 37 g (= 50% d.Th.) Mol.-Gew.: 367,2
Schmp.: 144,5-146° (Lit.: 140-146°)
$[\alpha]_D^{25}$ = -31,0° (c=1; Essigester) (Lit.: -31,0°)

Boc-Glu-γ-OBzl-α-ONp[43]:

33,8 g (100 mMol) Boc-Glu-γ-OBzl und 16,7 g (120 mMol) p-Nitrophenol wurden in 150 ml Essigester gelöst, auf -10° abgekühlt, 20,6 g (100 mMol) DCCI in Essigester zugegeben, 2 Std. bei -10° und 2 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, mit Essigester nachgewaschen und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Umkristallisation aus Äthanol.

Ausbeute: 37 g (= 80% d.Th.) Mol.-Gew.: 458,5
Schmp.: 119° (Lit.: 123°)
$[\alpha]_D^{25}$ = -33,5° (c=2; DMF) (Lit.: -33,5°)

Ac-Gly-ONp[44] wurde freundlicherweise von Herrn Diplom-Biochemiker K.-H. Herzog überlassen.

2.5.4. Boc-Aminosäure-Harz:

Chlormethyl-Harz:

Käufliches, 2% vernetztes Polystyrol-Harz wurde sorgfältig mit 1N NaOH, H_2O, 1N HCl, H_2O und DMF gewaschen, in CH_2Cl_2 suspendiert und nach Aufschwimmen des Harzes die feinen Partikel mit dem schwereren CH_2Cl_2 abgelassen. Nach Waschen mit Methanol wurde trockengesaugt und über $CaCl_2$ i. V. getrocknet.
Zur Chlormethylierung[45] wurden 85 g gewaschenes Harz in 340 ml Chlormethylmethyläther und 250 ml Chloroform suspendiert und zum Quellen 1 Stunde lang gerührt. Nach Abkuhlen im Eisbad wurden 8-12 ml $SnCl_4$ (je nach gewünschtem Beladungsgrad) in 85 ml Chlormethylmethyläther zugegeben und 1-2 Stunden gerührt. Danach wurde das Harz abgesaugt, mit Dioxan-Wasser (3:1) und Dioxan-Methanol-Gemischen bis zum reinen Methanol gut ausgewaschen, trockengesaugt und i. V. über $CaCl_2$ getrocknet. Durch Chlorbestimmung wurde der Beladungsgrad festgestellt; je nach Zugabe von $SnCl_4$ und Reaktionsdauer bewegt sich dieser zwischen 1,3 und 2,2 mMol CH_2Cl-Gruppen/g Harz.

Anesterung der Boc-Aminosäure ans Harz[46]:

Das Chlormethylharz wurde, entsprechend seiner Beladung, zusammen mit der 1,5fachen molaren Menge Boc-Aminosäure in Äthanol-Essigester (1:3) suspendiert (bei Asn nur Essigester), die 1,45fache molare Menge Triäthylamin zugegeben und unter Rückfluß und Rühren 24 Stunden lang erhitzt. Danach Abfiltrieren, Waschen mit heißem Essigester, Essigester-Äthanol-Gemischen bis zum reinen Äthanol, Methanol; Trockensaugen und Trocknen i. V. über $CaCl_2$. Die Beladung des Harzes wurde durch saure Hydrolyse der Esterbindung und anschließende quantitative Aminosäurebestimmung ermittelt.

Acetoxymethyl-Harz[47]:

Chlormethyl-Harz (2,15 mVal Cl/g) wurde mit der 1,1fachen molaren Menge an Kaliumacetat in Methylcellosolve für 24 Stunden auf 140° erhitzt. Absaugen, Auswaschen mit heißem Methylcellosolve, heißem Wasser, Wasser-Methanol-Gemischen bis zum reinen Methanol. Trocknen i. V. über $CaCl_2$. Die Chloranalyse ergab, daß die Chlormethylgruppen fast vollständig verestert worden waren. (Rest: 0,07 mVal/g).

Brommethyl-Harz:

Acetoxymethyl-Harz wurde in Trifluoressigsäure suspendiert und für 15 Minuten HBr durchgeleitet. Absaugen, Nachwaschen mit TFA, Eisessig und Methylenchlorid. Trocknen über KOH/P_2O_5. Die Bromanalyse ergab 1,7 mVal Br/g.

Boc-Asn-Harz aus Brommethyl-Harz:

Analog der Herstellung aus Chlormethyl-Harz. Reaktionsdauer nur 3 Stunden. Anschließend wurde versucht, die noch freien Brommethylgruppen durch 3-stündiges Kochen mit Triäthylammoniumacetat in Essigester (40fache molare Menge) abzublocken. Beladung: 0,39 mMol Boc-Asn/g Harz. Es verblieben noch 0,39 mVal Br/g Harz.

2.6. Merrifield-Synthese der A-Ketten

2.6.1. Methodik der Synthese

Die Synthese wurde in abgewandelter Weise[48,49] nach dem von MERRIFIELD angegebenen Verfahren[8] durchgeführt. Die Aminosäuren wurden in Form ihrer Boc-Derivate eingeführt; ihre Seitenkettenfunktionen waren bis auf die Hydroxylgruppe des Threonins geschützt: Cystein wurde als SBzl-, SAM- oder SBM-Cys, Glutaminsäure als γ-Benzylester, Histidin als N^1-Bzl-His, Serin als OBzl-Ser und Tyrosin als OBzl-Tyr eingesetzt. Die Anknüpfung erfolgte im allgemeinen mit DCCI als Kupplungsreagenz; nur Boc-Asn,

Boc-Gln, Ac-Gly und bei manchen Ketten auch Boc-Glu(Bzl) wurden als p-Nitrophenylester eingeführt. Es wurde möglichst unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit gearbeitet; die Lösungsmittel waren bis auf Äthanol destilliert und wasserfrei.
Die zur Anknüpfung eines Aminosäurerestes an das Boc-Aminosäure-Harz bzw. an das Boc-Peptid-Harz durchgeführten Arbeitsgänge sind (für einen Ansatz von 1,0 mMol) im folgenden Schema aufgeführt:

Schritt Nr.	Kupplung mit DCCI	Kupplung mit p-Nitrophenylestern
1	3 x waschen mit je 25 ml AcOH	
2	30 Min. mit 30 ml 1 N HCl/AcOH schütteln	
3	4 x waschen mit je 25 ml AcOH	
4	5 x waschen mit je 25 ml CH_2Cl_2	
5	10 Min. mit 3 ml Et_3N in 20 ml CH_2Cl_2 schütteln	
6	4 x waschen mit je 25 ml CH_2Cl_2	
7	Zugabe der Boc-Aminosäure in möglichst wenig Methylenchlorid; 10 Min. schütteln	3 x waschen mit je 25 ml DMF
8	Zugabe der äquimolaren Menge an 2 M DCCI-Lösung in Methylenchlorid; 1,5 bis 3 Std. schütteln	Zugabe des Boc-Aminosäure-p-Nitrophenylesters in möglichst wenig DMF; 12 bis 18 Std. schütteln
9	4 x waschen mit je 25 ml CH_2Cl_2	4 x waschen mit je 25 ml DMF
10	4 x waschen mit je 25 ml Äthanol	

Die Menge an zugegebener Aminosäure war bei den Synthesen verschieden. Im allgemeinen wurde mit der 4-5fachen molaren Menge gearbeitet.
Bei der Kette Nr.1 (3.1.) wurde zusätzlich zu den oben angeführten Schritten nach Kupplung und Auswaschen manchmal nochmals mit der Aminosäure gekuppelt[50] oder eine Acetylierung durchgeführt. Dabei wurde mit dem selben Überschuß an Aminosäure bzw. dem 200fachen Überschuß an Eisessig und der dazu äquimolaren Menge an DCCI

nochmals für 30 Min. reagieren gelassen.
War es nötig, die Synthese zu unterbrechen, so erfolgte dies nur am Ende eines Reaktionszyklus. Über Nacht wurde das Harz in äthanolfeuchtem Zustand aufgehoben, für längere Unterbrechungen wurde es im Vakuum über $CaCl_2$ getrocknet.
Nach 20 Reaktionszyklen war die Synthese der A-Kette beendet, das Harz wurde gut ausgewaschen, getrocknet und dann das Peptid vom Harz abgespalten (siehe 2.6.3.).

2.6.2. Analytische Verfolgung der Synthese

Der Verlauf der Synthese wurde überwacht, indem nach jedem Kupplungsschritt durch Chloridtitration nach DORMAN[51] die Menge der freien Aminogruppen, die sich nicht am Umsatz beteiligt hatten, bestimmt wurde. Parallel dazu wurde ebenfalls auf jeder Stufe die Zahl der gesamten Aminogruppen bestimmt.
Bestimmung der Gesamt-Aminogruppen:
Nach Abspaltung des Boc-Restes mit HCl/Eisessig liegt die endständige Aminogruppe als Hydrochlorid vor und wird durch Behandlung mit Triäthylamin wieder in ihre freie Form überführt. Die Flüssigkeiten des Schrittes Nr. 5 und 6 wurden gesammelt, mit etwas bidest. Wasser versetzt, das Methylenchlorid am Rotationsverdampfer abgezogen und mit bidest. Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Der potentiometrisch bestimmte Chloridgehalt in mVal dieser Lösung entspricht der mMol-Menge an freien Gesamt-Aminogruppen.
Bestimmung der Umsatzrate:
Nach Beendigung der Kupplung wurde wie üblich ausgewaschen. Nach 3 zusätzlichen Waschungen mit Methylenchlorid wurde das Harz mit 25 ml einer 0,3 M Pyridinhydrochlorid-Lösung in Methylenchlorid für 10 Min. geschüttelt; dabei werden die unumgesetzten Aminogruppen in ihr Hydrochlorid überführt. Nach je dreimaligem Waschen mit CH_2Cl_2 und DMF wurden die Aminogruppen durch dreiminütiges Behandeln mit 2 ml Et_3N in 20 ml DMF wieder freigesetzt. Die Flüssigkeiten dieses Schrittes sowie der 3 folgenden DMF-Waschungen wurden gesammelt, mit

15 ml bidest. Wasser versetzt und ihr Chloridgehalt potentiometrisch bestimmt.
Das frische Boc-Aminosäure-Harz hält auch schon etwas Chlorid fest, sodaß gilt:

Umsatzrate in % = (mMol Gesamtaminogruppen - mMol nicht umgesetzte Aminogruppen + Nullwert des Boc-Aminosäureharzes in mVal Cl^-) · 100

2.6.3. Abspaltung des Peptids vom Harz

Das fertig synthetisierte, geschützte Peptid wurde durch saure Hydrolyse seiner Esterbindung zum Harz vom Träger abgespalten. Die Hydrolyse wurde mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur vorgenommen. Unter diesen Bedingungen werden auch der aminoendständige Boc-Rest, der γ-Benzylester der Glutaminsäure und der O-Benzyl-Rest des Serins und des Tyrosins abgespalten; die Peptidbindungen und die Schwefelschutzgruppen werden nicht angegriffen.
Das getrocknete Peptidharz wurde in der etwa 10fachen Menge seines Volumens an TFA suspendiert, für 1 Stunde HBr durch die Suspension geleitet, unter Feuchtigkeitsausschluß abgesaugt und mehrmals mit TFA nachgewaschen. Die vereinigten Waschflüssigkeiten wurden im Vakuum eingedampft und das zurückbleibende Öl zur völligen Entfernung des HBr noch mehrmals mit TFA aufgenommen und wieder eingedampft. Schließlich wurde in wenig TFA gelöst und das Peptid mit abs. Äther unter Eiskühlung ausgefällt, abzentrifugiert und mit Äther säurefrei gewaschen. Trocknen i. V. über P_2O_5 /KOH. Eine weitere Fraktion an Peptid konnte noch gewonnen werden, indem das Harz nach kurzem Waschen mit Äthanol für längere Zeit mit mehreren Portionen DMF extrahiert wurde. Das mit Äther aus den DMF-Extrakten ausgefällte Peptid wurde der ersten Fraktion zugeschlagen.

2.7. Abspaltung der Schwefel-Schutzgruppen

2.7.1. Abspaltung des S-Benzyl-Restes

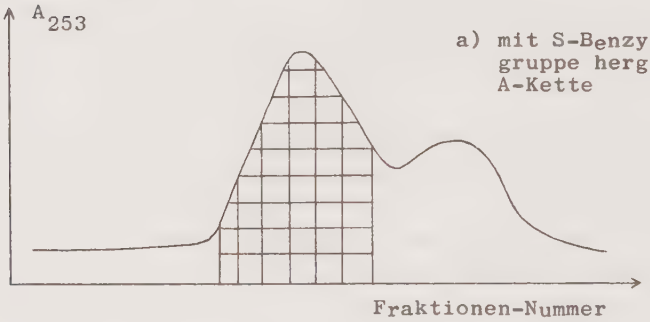
Die S-Benzyl-Schutzgruppe wurde nach DU VIGNEAUD[52] mit Natrium in flüssigem Ammoniak reduktiv entfernt. Um Luftfeuchtigkeit so weit wie möglich auszuschließen, wurde mit einer Spezialapparatur[15] gearbeitet.
250 mg S-geschützte A-Kette wurden in ca. 100 ml frisch über Natrium destilliertem Ammoniak gelöst und bis zur bleibenden schwachblauen Färbung mit einer Lösung von Natrium in Ammoniak versetzt. Dieser Zustand wurde 1/2 Minute lang unter Rühren beibehalten. Dann wurde bis zur Entfärbung festes NH_4Cl zugegeben und der Ammoniak im Vakuum unter starkem Rühren abgezogen. Dabei erstarrte die Lösung und es wurde über Nacht bis zur Trockene lyophilisiert.
Um die nun in reduzierter Form vorliegende Kette in ihre S-Sulfonat-Form zu überfuhren, wurde der pulverige Rückstand in 10 ml Wasser suspendiert und durch Einstellen des pH auf 9,2 in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 30 ml 0,2 M Tris-Puffer pH 9,2, sowie von 2,0 g Na_2SO_3 und 1,6 g Natriumtetrathionat wurde für 3 Std. bei 37° inkubiert. Das nach Dialyse und Gefriertrocknen erhaltene Produkt wurde noch uber Sephadex G-25 fraktioniert (siehe 2.8.).

2.7.2. Abspaltung der Disulfid-Schutzgruppen

Die S-Äthylmercapto- und die S-Benzylmercapto-Schutzgruppe lassen sich leicht durch Sulfitolyse abspalten[29,40].
350 mg S-geschützte Kette wurden in 30 ml 0,2 M Tris-Puffer pH 9,2 gelöst, 2,0 g Na_2SO_3 und 1,6 g Natriumtetrathionat zugegeben und dann für 4 Std. bei 37° inkubiert. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurde noch an Sephadex G-25 fraktioniert.

2.8. Gelfiltration an Sephadex G-25

Die Kettenprodukte wurden in 3-5 ml 0,02 M NH_4HCO_3-Lösung aufgenommen und auf eine mit dem selben Puffer äquilibrierte Säule mit Sephadex G-25 aufgetragen. Bis 150 mg A-Kette wurde eine Säule von den Ausmaßen 2,5 x 83 cm, bei größeren Mengen eine solche mit 3,5 x 94 cm benutzt. Die Elution erfolgte mit dem selben Puffer bei einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 30 ml / $h \cdot cm^2$. Es wurden die Absorptionen im Durchflußphotometer bei 253 nm gemessen und Fraktionen von 5 ml aufgefangen.



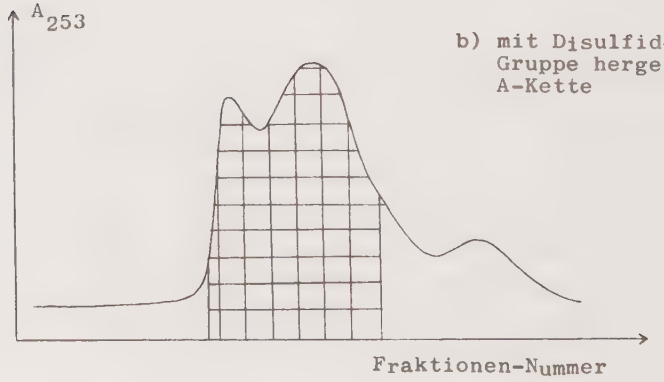


Abb.2: Elutionsdiagramme der synthetischen Ketten

2.9. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex

Die synthetischen A-Ketten wurden nach der Molekulargewichtsfraktionierung an Sephadex einer Reinigung an DEAE-Sephadex A-25 unterzogen; dabei wurde die von SHIMONISHI und ZAHN angegebene Methode[53,54] in modifizierter Weise verwendet. Die auf Grund ihrer S-Sulfonat-Gruppen stark saure A-Kette wird von dem Ionenaustauscher fest gebunden und läßt sich nur mit verdünnter HCl wieder eluieren. Dabei hängt die Molarität der HCl, mit der sich die Ketten eluieren lassen, in linearer Funktion von deren Ladung ab:

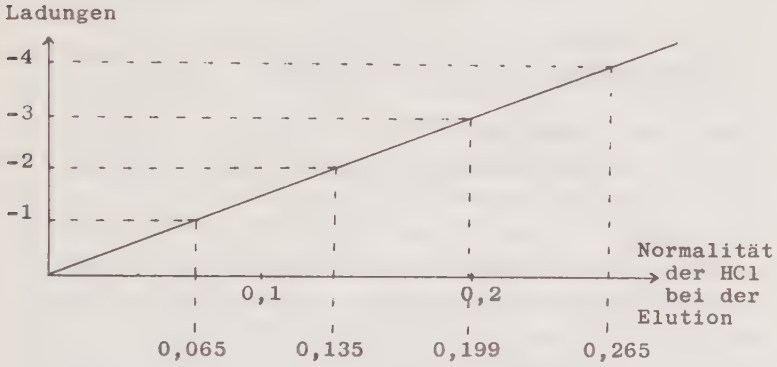


Abb.3:

Eine S-Sulfonat-A-Kette vom Schaf, die im Sauren 3 negative Ladungen besitzt (4 S-SO_3^-- und eine aminoendständige NH_3^+-Gruppe), wird also mit 0,199 N HCl eluiert, Verunreinigungen mit geringerer Ladung lassen sich so bei stufenweiser Elution früher, solche mit höherer Ladung später eluieren.
Der Austauscher wurde in seiner Acetat-Form und mit 8 M Harnstofflösung äquilibriert eingesetzt. Bis 100 mg A-Kette wurde eine Säule von 1,2 x 15 cm, bis 250 mg eine von 1,5 x 15 cm und darüber von 2,2 x 12 cm benutzt. Die A-Kette wurde in 2-3 ml 8 M Harnstofflösung auf die

Säule aufgetragen. Dann wurde zuerst mit 8 M Harnstofflösung und dann stufenweise mit den aus dem Diagramm ersichtlichen HCl-Lösungen, die alle 8 M an Harnstoff waren, eluiert. Die Absorption des Eluats wurde bei 280 nm gemessen und Fraktionen von 5 ml aufgefangen. Mit jedem Puffer wurde so lange eluiert, bis die Absorptionskurve wieder auf die Nullinie zurückging. Die Tropfgeschwindigkeit betrug ca. 50 ml/h·cm^2.
Die Fraktionen des Peaks, der ladungsmäßig der A-Kette entsprach, wurden gesammelt, mit festem NH_4HCO_3 neutralisiert, gut dialysiert und lyophilisiert. Anschließend wurde nochmals über Sephadex G-25 gereinigt.

2.10. Rekombination der A-Ketten mit natürlicher Rinder-B-Kette zu Hybridinsulinen

Es wurde nach KATSOYANNIS[55] gearbeitet, der die reduzierte A-Kette in 5fachem Überschuß mit S-Sulfonat-B-Kette rekombiniert:

$$AS^- + BSSO_3^- \rightleftharpoons ASSB + SO_3^{--}$$

Alle dabei verwendeten Lösungen wurden mit bidest. Wasser hergestellt und mit Stickstoff begast. Die Reduktion der A-Kette und die nachfolgende Extraktion des überschüssigen Mercaptoäthanols wurden in einer kleinen Kutscher-Steudel-Apparatur unter Stickstoffatmosphäre vorgenommen.
10 mg A-Kette wurden in 2,5 ml Wasser gelöst und der pH auf 5,0 eingestellt. Nach Zugabe von 0,5 ml 1 M wässriger Mercaptoäthanol-Lösung wurde für 6 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde 3 Std. lang mit Essigester unter Rückfluß und Eiskühlung extrahiert. Der überstehende Essigester wurde dann abgehebert und durch Durchblasen von Stickstoff und kurzes Evakuieren vollends entfernt. Das gallertig-trube Reduktionsgemisch wurde auf 2,50 mg $BSSO_3^-$ gegeben und mit N/10 NaOH auf pH 10,6 eingestellt. Dabei gingen die beiden Ketten in Lösung. Schließlich wurden noch 1,5 ml 0,1 M Natriumglycinat-Puffer pH 10,6 zugegeben und die klare Lösung, die eine Proteinkonzentration von ca. 2,5 mg/ml hat, bei +2° unter

Zutritt von Luftsauerstoff gerührt. Nach 14-20 Stunden wurde mit verd. HCl auf pH 7,5 eingestellt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10,0 ml aufgefüllt.

Berechnet auf die eingesetzte B-Kette, können in den 10 ml Lösung maximal 4,0 mg Insulin entstanden sein. Auf diesen Wert wurden die prozentualen Aktivitäten des biologischen Tests bezogen.
Die Rekombination natürlicher Rinder-Ketten ergab eine mittlere Aktivität von 62%. (Standardabweichung: s=$\pm$ 16 oder $\pm$ 26% vom Mittelwert; Zahl der Mäuse: 220)

2.11. Biologische Testung der Hybridinsuline

Die Bestimmung der biologischen Aktivität der halbsynthetischen Insuline erfolgte im Gaztiertest an der Maus. Der Test wurde nach der von YOUNG und LEWIS beschriebenen Methode[56] durchgeführt. In Abänderung dieses Verfahrens wurde bei 30° und mit Mäusen gearbeitet, die 1 Tag vorher nüchtern gesetzt worden waren. Um die Schwankungsbreite des Testes möglichst gering zu halten, wurden die Testbedingungen bei allen Bestimmungen streng gleich gehalten. Die Mäuse hatten ein durchschnittliches Gewicht von 18 g und wurden vor dem Test in Zehnergruppen mit gleicher Gewichtsverteilung eingeteilt.
Die Tiere einer solchen Gruppe wurden intraperitoneal mit je 0,1 ml der selben Testlösung gespritzt und in einen schräg stehenden, langsam rotierenden Maschendrahtzylinder gesetzt. Fiel eine Maus innerhalb von 10 Minuten aus dem Zylinder nach unten heraus, so wurde sie wieder hineingesetzt. Man ließ den Zylinder 60 Min. lang rotieren, während deren, je nach Aktivität und Dosis der Insuline, ein kleiner oder größerer Teil der Mäuse herabfiel, weil sie infolge der Insulinwirkung nicht mehr im Stande waren, sich in der rotierenden Trommel zu halten.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden mehrer Mäusegruppen mit Rinderinsulin gespritzt, und zwar mit Dosen zwischen 0,2 und 1,7 µg pro Maus, und die entsprechenden Werte an

gefallenen Mäusen ermittelt. Da die Schwankungsbreite des Testes recht groß ist, wurde aus den Eichkurvenwerten eines Jahres eine Standardeichkurve extrapoliert, die als Grundlage zur Ermittlung unbekannter Aktivitäten diente:

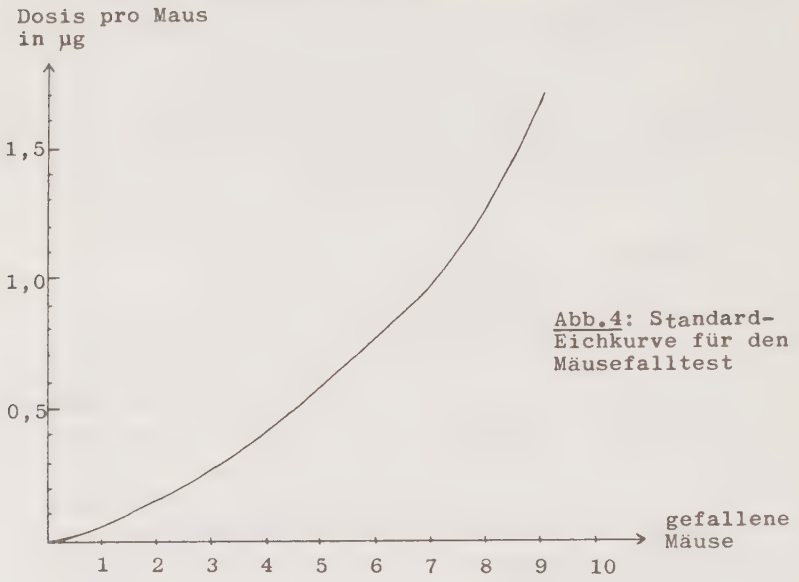


Abb.4: Standard-Eichkurve für den Mäusefalltest

Zur Bestimmung der Aktivitäten von Hybridinsulinen mußte zuerst durch Stichteste diejenige Dosis ermittelt werden, bei der die Zahl der abgestürzten Mäuse in den annähernd linearen Bereich (5-8 Mäuse) der Eichkurve fiel. Die Rekombinationslosung mußte dementsprechend mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden. Hatte man die richtige Verdünnung gefunden, so wurden mit dieser 10 bis 20 Zehnergruppen gespritzt, um das Ergebnis statistisch auswerten zu können.
Die Aktivität wurde dann auf folgende Weise errechnet: Aus der Zahl der gefallenen Mäuse ermittelte man anhand der Eichkurve die Dosis an Insulin, die die Mäuse effektiv erhalten hatten. Durch Vergleich mit dem theoretischen Maximalinsulingehalt der Rekombinationslösung errechnet sich unter Berücksichtigung der Verdünnung die Aktivität

des Hybridinsulins. Dieser Wert wurde für jede Mäusegruppe einzeln ausgerechnet und aus den erhaltenen Einzelwerten Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Synthese einer Rinder-A-Kette unter Verfolgung des Umsatzes (Kette Nr. 1) :

Ansatz: 1,46 mMol. Beladung des Harzes: 0,15 mMol Boc-Asn/g. Es wurde jeweils die 6,5fache molare Menge an Aminosäure eingesetzt, bezogen auf das carboxylendständige Asn; das entspricht Konzentrationen von 0,15 Mol/l. Beim Acetylieren wurde die 200fache Menge an Eisessig genommen. Glutaminsäure wurde als p-Nitrophenylester gekuppelt. Reaktionsdauer bei Kupplung mit DCCI: 2 Std.
Bei jedem Reaktionszyklus wurden die Zahl der Gesamtaminogruppen, die nicht umgesetzten Aminogruppen und die Umsatzrate bestimmt. Diese Werte können aus Abb. 5 entnommen werden.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 44%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf S-Benzyl-Kette): 49%

Ausbeute an (nach 2.9.) gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 8%
bezogen auf Asn am Harz: 1,7%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 0,7% Standardabweichung: s=± 0,45 oder ± 65% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 50

gereinigte Kette: 3,1% Standardabweichung: s=± 1,0 oder ± 32% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse:170

3.2. Vergleichende Synthesen einiger [Ala^{12}]Schaf-A-Ketten

3.2.1. Synthese mit S-Benzyl-Schutzgruppe (Kette Nr. 2) :

Ansatz: 0,5 mMol. Beladung des Harzes: 0,65 mMol Boc-Asn/g. Es wurde jeweils die 4fache molare Menge an Aminosäure eingesetzt; das entspricht Konzentrationen von 0,4 Mol/l.

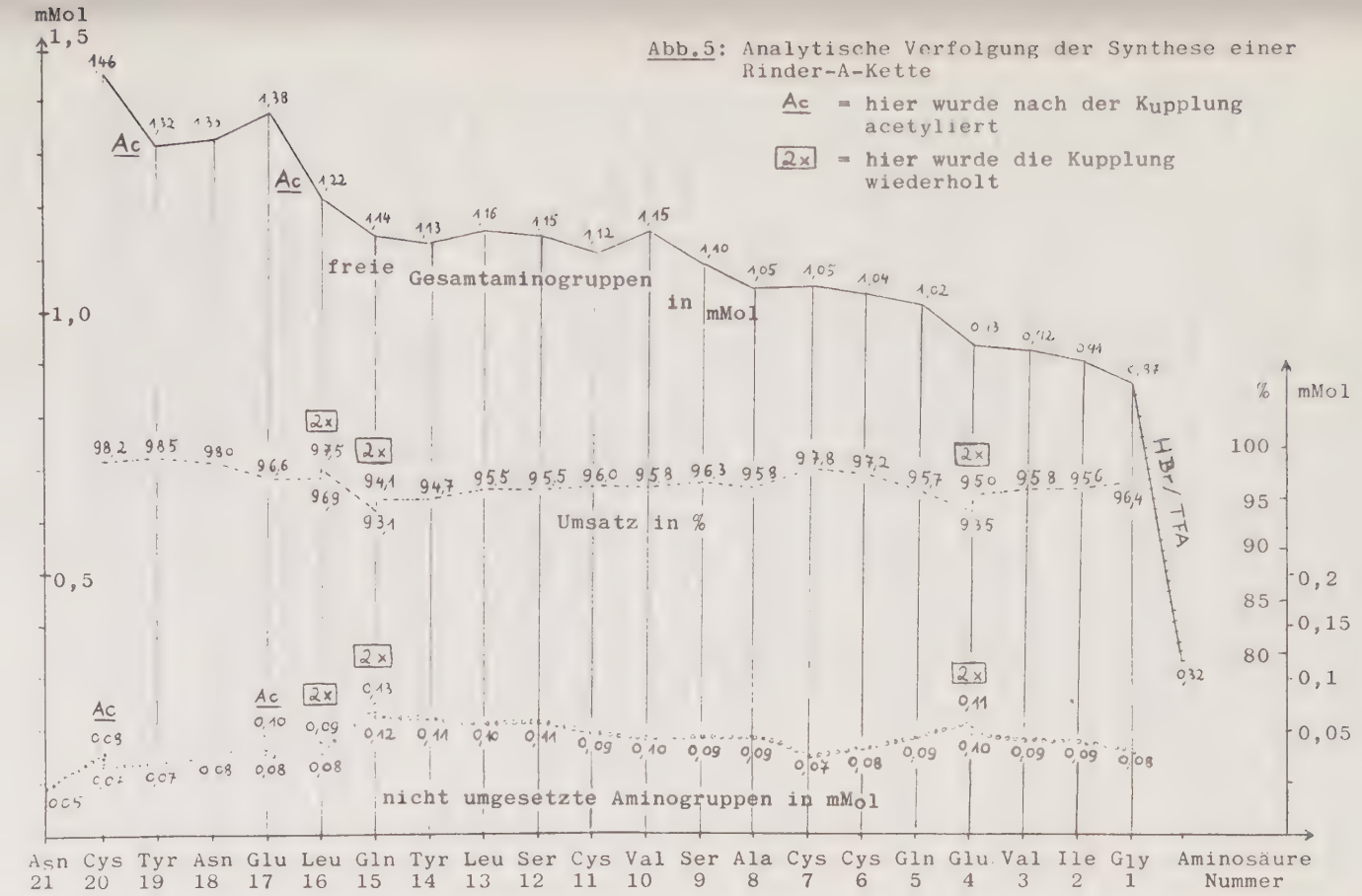


Abb.5: Analytische Verfolgung der Synthese einer Rinder-A-Kette

Ac = hier wurde nach der Kupplung acetyliert

2x = hier wurde die Kupplung wiederholt

Glutaminsäure wurde als p-Nitrophenylester angekuppelt.

Reaktionsdauer bei DCCI-Kupplung: 3 Std.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 57%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf S-Benzyl-Kette): 34%

Ausbeute an (nach 2.9.) gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 24%
bezogen auf Asn am Harz: 4,7%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 5,4% Standardabweichung: s=± 1,9 oder ± 35% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 150

gereinigte Kette: 12,3% Standardabweichung: s=± 2,2 oder ± 18% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 90

3.2.2. Synthese mit S-Äthylmercapto-Schutzgruppe (Kette Nr.3):

Ansatz: 0,5 mMol. Beladung des Harzes: 0,5 mMol Boc-Asn/g. Es wurde jeweils die 5fache molare Menge an geschützter Aminosäure eingesetzt; das entspricht Konzentrationen von 0,4 Mol/l. Reaktionsdauer bei DCCI-Kupplung: 2 Std.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 14%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf SÄM-Kette): 64%

Ausbeute an (nach 2.9.) gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 32%
bezogen auf Asn am Harz: 2,9%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 4,5% Standardabweichung: s=± 1,2 oder ± 27% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 200

gereinigte Kette: 8,0% Standardabweichung: s=± 1,7 oder ± 21% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse 130

3.2.3. Synthese mit S-Benzylmercapto-Schutzgruppe (Kette Nr.4):

Ansatz: 1,0 mMol. Beladung des Harzes: 0,5 mMol Boc-Asn/g. Rest-Chlorgehalt des Harzes: 0,62 mVal Cl/g. Boc-Gly, Boc-Ile und Boc-Val wurden in 20facher molarer Menge (Konzentration 1,0 Mol/l), Boc-Asn, Boc-Gln und Boc-Tyr (Bzl) wurden in 15facher molarer Menge (Konzentration 0,8 Mol/l), Boc-Glu (OBzl) und Boc-Leu wurden in 10facher molarer Menge (Konzentration 0,65 Mol/l) und Boc-Cys (SBM) wurde in 5facher molarer Menge (Konzentration 0,45 Mol/l) eingesetzt.

Reaktionsdauer bei DCCI-Kupplung: 1,5 Std.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 36%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf SBM-Kette): 75%

Ausbeute an (nach 2.9.) gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 29%
bezogen auf Asn am Harz: 7,8%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 3,0% Standardabweichung: s=± 1,2 oder ± 40% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 160

gereinigte Kette: 9,8% Standardabweichung: s=± 3,2 oder ± 33% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 310

3.2.4. Synthese mit S-Benzylmercapto-Schutzgruppe und modifiziertem Harz (Kette Nr.5):

Es wurde ein über das Brommethylharz hergestelltes Boc-Asn-Harz verwendet. Beladung: 0,38 mMol Boc-Asn/g; Rest-Brom-Gehalt: 0,39 mVal Br/g.

Ansatz: 1,0 mMol. Überschuß an Aminosäuren und Konzentrationen analog Kette Nr.4. Reaktionsdauer bei DCCI-Kupplung: 1,5 Std.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 34%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf SBM-Kette): 74%

Ausbeute an (nach 2.9.) gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 29%
bezogen auf Asn am Harz: 7,4%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 3,1% Standardabweichung: s=± 1,0 oder ± 31% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 130

gereinigte Kette: 10,6% Standardabweichung: s=± 4,3 oder ± 41% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 310

3.3. Versuche zur Reinigung der synthetischen A-Ketten

Die synthetischen S-Sulfonat-A-Ketten waren auch noch nach der Fraktionierung über Sephadex G-25, bei der nur Bruchstücke und Kettenstümpfe mit erheblich kleinerem Molekulargewicht abgetrennt werden können, stark verunreinigt. Die Elektropherogramme zeigen neben der Hauptbande meist noch 5 bis 7 verschieden starke Nebenbanden (siehe Abb.6). Es wurde versucht, die Ketten unter verschiedenen Bedingungen durch Ionenaustauschchromatographie zu reinigen. Dazu boten sich zwei Möglichkeiten an: Reinigung auf der Stufe der S-geschützten Ketten oder Reinigung der S-Sulfonat-Ketten.

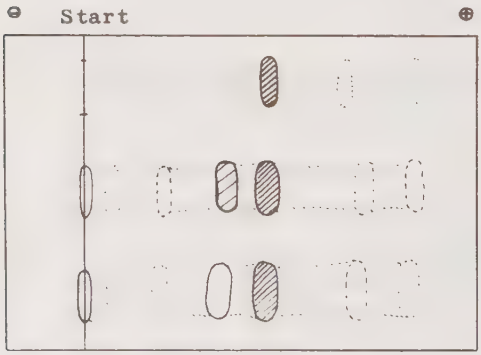


Abb.6: Elektrophoretisches Verhalten der synthetischen [Ala^{12}]Schaf-A-Ketten. Bedingungen siehe 2.3.2.

3.3.1. Reinigung der S-geschutzten Ketten

Bei der Reinigung auf dieser Stufe kann man theoretisch Kettenstumpfe bis zum Gln^5, Ketten mit nicht abgespaltenen Carboxylschutzgruppen und in geringem Maße Fehlsequenzen entfernen, muß aber in Kauf nehmen, daß bei der folgenden Abspaltung der Schwefelschutzgruppen wieder Verunreinigungen hinzukommen, so daß auf der Stufe der S-Sulfonat-Kette eine weitere Reinigung folgen mußte.
Die S-geschutzten Ketten liegen wegen ihrer zwei Glutaminsäuren und der endständigen COOH-Gruppe im Alkalischen als Anion vor; deshalb wurde versucht, sie am Anionenaustauscher DEAE-Sephadex zu reinigen.

Versuch der Reinigung der S-Benzyl-Kette: Die Kette wurde mit NaOH in wenig Wasser gelöst und auf eine mit 0,005 M Tris.HCl-Puffer (pH 8,0 und 8 M an Harnstoff) äquilibrierte DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten des Startpuffers gegen einen 0,032 M Tris·HCl-Puffer pH 8,0, der 0,3 M an NaCl und 8 M an Harnstoff war. Dabei wurden zwei Proteinfraktionen eluiert, die Verunreinigungen entsprachen; die Kette aber ließ sich nicht eluieren, auch nicht bei einer erhohten Kochsalzkonzentration von 1,5 Mol/l. Sogar mit 2 N NaOH war sie nicht mehr vom Austauscher abzulösen, an den sie vermutlich durch unspezifische Adsorption festgehalten wurde.

Reinigung der SAM-Kette: Im Gegensatz zur S-Benzyl-Kette ließ sich die SAM-Kette wieder vom Austauscher eluieren. Sie wurde bei pH 8,5 gelöst und auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen, die mit 0,01 M Ammoniumformiat-Puffer pH 8,5 und 8 M an Harnstoff äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten des Startpuffers gegen einen 1,0 M Ammoniumformiat-Puffer pH 8,5 und 8 M an Harnstoff. Der Hauptpeak wurde unter den selben Bedingungen rechromatographiert. Ausbeute nach Dialyse und Gefriertrocknen: 20%. Nach Abspaltung der SAM-Schutzgruppe zeigte das Produkt im Elektropherogramm genau die selben Nebenflecken wie ohne Reinigung; auch die Amino-

saureanalyse und die Aktivität des Hybridinsulins waren nicht besser, so daß diese Reinigung nicht effektiv ist.

3.3.2. Reinigung der S-Sulfonat-Ketten

Bei der Reinigung auf dieser Stufe können Kettenstümpfe, sofern sie eine andere Ladung als die ganze Kette besitzen, und Ketten, bei denen ein Cystein fehlt oder noch geschützt ist, entfernt werden. Die S-Sulfonat-A-Ketten sind stark sauer, werden also von DEAE-Sephadex festgehalten.

Versuch der Elution bei pH 9,5 mit einem NaCl-Gradienten:

Es wurde nach GRIFFIN et al.[57] verfahren. Die A-Ketten konnten aber unter diesen Bedingungen nicht mehr vom Austauscher eluiert werden, auch wenn die NaCl-Konzentration bis auf 3,0 Mol/l erhöht wurde.

Stufenweise Elution mit verd. HCl in Gegenwart von Harnstoff:

Mit diesem von SHIMONISHI und ZAHN beschriebenen Verfahren[53,54] konnten die Ketten in gut reproduzierbarer Weise gereinigt werden. Das Verfahren ist unter 2.9. ausführlich beschrieben.
Die Elutionskurve einer synthetischen [Ala^{12}]Schaf-A-Kette zeigt folgendes Bild:

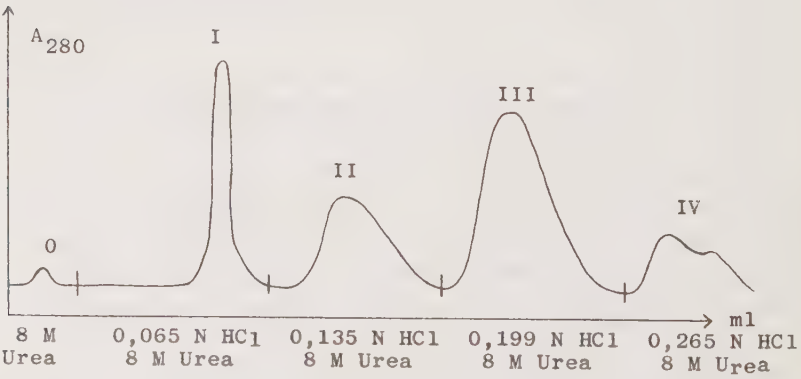


Abb.7:

Die einzelnen Peaks zeigen folgendes elektrophoretisches Verhalten:

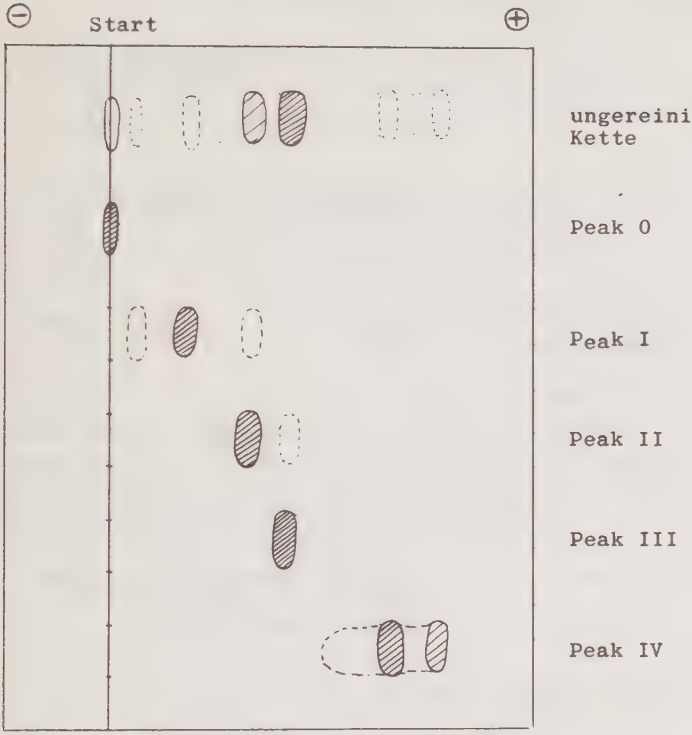


Abb.8: Elektrophoretisches Verhalten der einzelnen bei der Reinigung erhaltenen Peaks. Bedingungen siehe unter 2.3.2.

Im stark Sauren entspricht also Peak 0 Produktionen ohne Ladung, also vollkommen S-geschützten oder Cystein-S-Sulfonat-freien Peptiden. Peak I enthält hauptsächlich Produkte mit der Ladung -1 und Peak II solche mit der Ladung -2. Peak III entspricht mit seiner 3fach negativen Ladung der S-Sulfonat-Kette mit vier sauren und einer aminoendständigen NH_3^+ -Gruppe. Peak IV enthält Produkte, deren Aminogruppe blockiert ist.

3.4. Variation der Kettenlänge

3.4.1. Des-Ser^{12}-Schaf-A-Kette (Kette Nr. 6):

Ansatz: 0,5 mMol. Diese Kette wurde genau unter den selben Bedingungen sythetisiert wie Kette Nr. 3 (3.2.2.), nur mit dem Unterschied, daß die Aminosäure Nr. 12 weggelassen wurde.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 13%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf SÄM-Kette): 65%

Ausbeute an gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 30%
bezogen auf Asn am Harz: 2,6%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 0,14% Standardabweichung: s=± 0,29 oder ± 210% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 80

gereinigte Kette: 0,71% Standardabweichung: s=± 0,36 oder ± 50% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 90

3.4.2. N-Acetyl-[Ala^{12}]-Schaf-A-Kette (Kette Nr. 7):

Ansatz: 0,5 mMol. Die Kette wurde analog Kette Nr. 2 (3.2.1.) hergestellt. Da sich N-Acetyl-glycin in Methylenchlorid nicht löst, wurde es als p-Nitrophenylester gekuppelt.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 45%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf S-Benzyl-Kette): 40%

Die Kette hat eine negative Ladung mehr als die natürliche A-Kette. Sie wurde deshalb bei der Reinigung nach 2.9. erst mit 0,265 HCl eluiert.

Ausbeute an gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 24%
bezogen auf Asn am Harz: 4,3%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwert):

ungereinigte Kette: 2,5% Standardabweichung: s=± 0,8
oder ± 32% vom Mittelwert.
Zahl der Mäuse:100

gereinigte Kette: 10,3% Standardabweichung: s=± 1,2
oder ± 12% vom Mittelwert.
Zahl der Mäuse: 70

3.5. Variationen im intrachenaren Ring

3.5.1. [Ala^{9}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette (Kette Nr. 8)

Sequenz: Gly .....Cys.Cys.Ala.Ala.Val.Cys.Ala.Leu....Asn
1 6 7 8 9 10 11 12 13 21

Ansatz: 0,3 mMol. Die Kette wurde unter den selben Bedingungen hergestellt wie Kette Nr. 2 (3.2.1.).

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 61%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf S-Benzyl-Kette): 48%

Ausbeute an gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 18%
bezogen auf Asn am Harz: 5,3%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 1,2% Standardabweichung: s=± 0,96
oder + 80% vom Mittelwert.
Zahl der Mäuse:180

gereinigte Kette: 5,2% Standardabweichung: s=± 0,9
oder ± 17% vom Mittelwert.
Zahl der Mäuse: 60

3.5.2. [Ala^{10}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette (Kette Nr. 9):

Sequenz: Gly....Cys.Cys.Ala.Gly.Ala.Cys.Ala.Leu....Asn
1 6 7 8 9 10 11 12 13 21

Ansatz: 0,3 mMol. Die Kette wurde unter den selben Bedingungen hergestellt wie Kette Nr. 2 (3.2.1.).

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 49%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf S-Benzyl-Kette): 42%

Ausbeute an gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 29%
bezogen aus Asn am Harz: 6,0%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 5,0% Standardabweichung: s=± 1,4 oder ± 28% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 90

gereinigte Kette: 8,9% Standardabweichung: s=± 3,4 oder ± 38% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 140

3.5.3. [Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette (Kette Nr. 10):

Sequenz:	Gly	....	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Leu	....	Asn
	1		6	7	8	9	10	11	12	13		21

Ansatz: 0,3 mMol. Die Kette wurde unter den selben Bedingungen hergestellt wie Kette Nr. 2 (3.2.1.).

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carcoxylendständiges Asn): 55%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf S-Benzyl-Kette): 35%

Ausbeute an gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette: 27%
bezogen auf Asn am Harz: 5,2%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 0,29% Standardabweichung: s=± 0,22 oder ± 76% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 70

gereinigte Kette: 5,2 % Standardabweichung: s=± 2,9 oder 55% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse:140

3.5.4. [Ala^{12}]Hühner-A-Kette (Kette Nr. 11):

Sequenz:	Gly	....	Cys	Cys	His	Asn	Thr	Cys	Ala	Leu	....	Asn
	1		6	7	8	9	10	11	12	13		21

Ansatz: 0,3 mMol. Die Kette wurde unter den selben Bedingungen hergestellt wie Kette Nr. 2 (3.2.1.). His wurde als N^{i}-Bzl-His und Thr wurde ohne Hydroxylschutz eingesetzt.

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 61%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf S-Benzyl-Kette) 34%

Die Kette besitzt wegen ihres Histidins eine positive Ladung mehr als die Rinder-A-Kette. Sie hat sómit im Sauren die Ladung -2, wird also bei der Reinigung nach 2.9. schon mit 0,135 N HCl eluiert.

Ausbeute an gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette 22%
bezogen auf Asn am Harz: 4,6%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 8,3% Standardabweichung: s=± 3,2 oder ± 39% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 150

gereinigte Kette: 10,1% Standardabweichung: s=± 3,7 oder ± 37% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 150

3.6. Variationen unter Weglassung der intrachenaren Disulfidbrücke

3.6.1. [Ala^{6}, Ala^{11}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette (Kette Nr. 12):

Sequenz: Gly....Ala.Cys.Ala.Gly.Val.Ala.Ala.Leu....Asn
1 6 7 8 9 10 11 12 13 21

Ansatz: 0,5 mMol. Die Kette wurde unter den selben Bedingungen hergestellt wie Kette Nr. 3 (3.2.2.).

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 32%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf SAM-Kette): 65%

Die Kette besitzt wegen der fehlenden zwei Cysteinsulfonsäuren im Sauren nur die Gesamtladung -1 und wurde deshalb bei der Reinigung nach 2.9. schon mit 0,065 N HCl eluiert.

Ausbeute an gereinigter Kette
bezogen auf ungereinigte Kette 33%
bezogen auf Asn am Harz 6,9%

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivitäten des Hybridinsulins nach Rekombination mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwerte):

ungereinigte Kette: 0,18% Standardabweichung: s=± 0,11
oder ± 61% vom Mittelwert.
Zahl der Mäuse: 90

gereinigte Kette: 0,09% Standardabweichung: s=± 0,14
oder ±160% vom Mittelwert.
Zahl der Mäuse: 40

3.6.2. Des-Ser^{12}-[Ala^{6},Ala^{11}]Schaf-A-Kette (Kette Nr. 13):

Sequenz: Gly....Ala.Cys.Ala.Gly.Val.Ala.__O.Leu....Asn
1 6 7 8 9 10 11 12 13 21

Ansatz: 0,5 mMol. Die Kette wurde unter den selben Bedingungen hergestellt wie Kette Nr. 3 (3.2.2.).

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz (bezogen auf carboxylendständiges Asn): 35%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf SAM-Kette): 67%

Auf eine Reinigung der Kette wurde verzichtet.

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivität des Hybridinsulins nach Rekombination der ungereinigten Kette mit natürlicher Rinder-B-Kette (Mittelwert): 0,03% Standardabweichung: s=± 0,04
oder ± 133% vom Mittelwert.
Zahl der Mäuse: 90

3.6.3. Des-Cys^{11}, des-Ser^{12}-[Ala^{6}]Schaf-A-Kette (Kette Nr. 14):

Sequenz: Gly....Ala.Cys.Ala.Gly.Val.__O.__O.Leu....Asn
1 6 7 8 9 10 11 12 13 21

Ansatz: 0,5 mMol. Die Kette wurde unter den selben Bedingungen hergestellt wie Kette Nr. 3 (3.2.2.).

Ausbeute an S-geschützter Kette nach Abspaltung vom Harz(bezogen auf carboxylendständiges Asn): 35%

Ausbeute an S-Sulfonat-Kette (bezogen auf SAM-Kette): 67%

Auf eine Reinigung der Kette wurde verzichtet.

Aminosäureanalysen siehe unter 3.7.

Aktivität des Hybridinsulins nach Rekombination der ungereinigten Kette mit naturlicher Rinder-B-Kette (Mittelwert): 0,09% Standardabweichung: s=± 0,1 oder ± 110% vom Mittelwert. Zahl der Mäuse: 90

3.7. Aminosäureanalysen

Die Aminosäureanalysen sind alle auf Leucin bezogen, da dieses hydrolysenbeständig ist und nur im carboxylendständigen Teil der A-Kette vorkommt. Dadurch wird der durch die Synthese bedingte, zum Aminoende hin zunehmende Abfall der Aminosäuren deutlicher, so daß auch der Erfolg der Reinigung besser beurteilt werden kann.

Cysteinwerte sind nicht aufgeführt, da Cysteinsulfonsäure und die geschützten Cysteine nicht hydrolysenbeständig sind.Asparagin und Glutamin werden bei der sauren Hydrolyse desamidiert und wurden als Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure angegeben. Die Isoleucin- und Valin-Werte sind zum Teil deshalb zu nieder, weil die Ile-Val-Bindung unter den angegebenen Hydrolysenbedingungen nicht vollständig gespalten wird.

Die Abkürzungen bedeuten:

t = theoretischer Wert

S = S-geschützte Kette

u = ungereinigte Kette

g = gereinigte Kette

Kette Nr. 1

	t	S	u	g
Asp	2	2,08	1,66	1,31
Ser	2	0,62	1,18	1,57
Glu	4	2,73	2,75	3,42
Gly	1	0,21	0,21	0,29
Ala	1	0,64	0,72	1,21
Val	2	1,02	1,00	1,27
Ile	1	0,17	0,18	0,20
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,49	1,64	1,52

Kette Nr. 2

	t	S	u	g
Asp	2	2,12	1,52	1,55
Glu	4	3,39	3,74	3,76
Gly	2	1,66	1,48	1,35
Ala	2	1,78	2,20	2,01
Val	2	1,44	1,77	1,72
Ile	1	0,68	0,77	0,74
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,56	1,61	1,70

Kette Nr. 3

	t	S	u	g
Asp	2	-	2,03	1,80
Glu	4	-	3,98	3,70
Gly	2	-	1,78	1,80
Ala	2	-	2,02	1,92
Val	2	-	1,52	1,52
Ile	1	-	0,56	0,60
Leu	2	-	2,00	2,00
Tyr	2	-	1,77	1,78

Kette Nr. 4

	t	S	u	g
Asp	2	2,26	1,96	1,88
Glu	4	3,58	3,60	3,71
Gly	2	1,60	1,66	1,82
Ala	2	1,79	1,88	1,96
Val	2	1,49	1,50	1,64
Ile	1	0,60	0,57	0,71
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,70	1,68	1,74

Kette Nr. 5

	t	S	u	g
Asp	2	2,31	2,00	1,78
Glu	4	3,44	3,57	3,65
Gly	2	1,44	1,56	1,74
Ala	2	1,67	1,90	1,92
Val	2	1,24	1,43	1,60
Ile	1	0,41	0,45	0,57
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,85	1,77	1,77

Kette Nr. 6

	t	S	u	g
Asp	2	-	1,90	1,80
Glu	4	-	3,80	3,76
Gly	2	-	1,69	1,77
Ala	1	-	0,98	0,99
Val	2	-	1,31	1,47
Ile	1	-	0,48	0,55
Leu	2	-	2,00	2,00
Tyr	2	-	1,80	1,63

Kette Nr. 7

	t	S	u	g
Asp	2	2,10	1,78	1,72
Glu	4	3,68	3,45	4,00
Gly	2	1,68	1,87	1,93
Ala	2	2,02	2,59	2,06
Val	2	1,48	1,79	1,67
Ile	1	0,73	0,82	0,82
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,39	1,70	1,69

Kette Nr. 8

	t	S	u	g
Asp	2	2,16	1,78	1,77
Glu	4	3,57	3,80	3,89
Gly	1	0,86	0,84	0,94
Ala	3	2,71	3,41	3,13
Val	2	1,53	1,78	1,84
Ile	1	0,75	0,80	0,84
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,57	1,68	1,84

Kette Nr. 9

	t	S	u	g
Asp	2	1,99	1,70	1,90
Glu	4	3,35	3,79	4,00
Gly	2	1,63	1,67	1,90
Ala	3	2,54	3,21	3,14
Val	1	0,81	0,67	0,76
Ile	1	0,72	0,70	0,76
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,58	1,70	1,78

Kette Nr. 10

	t	S	u	g
Asp	2	2,09	1,55	1,78
Glu	4	6,14	3,58	3,78
Gly	1	0,92	0,64	0,82
Ala	4	3,58	4,18	3,91
Val	1	0,83	0,66	0,65
Ile	1	0,79	0,62	0,67
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,76	1,58	1,69

Kette Nr. 11

	t	S	u	g
Asp	3	2,82	2,56	2,79
Thr	1	0,83	0,46	0,57
Glu	4	3,56	3,65	3,80
Gly	1	0,82	0,56	0,77
Ala	1	0,95	1,24	1,09
Val	1	0,63	0,69	0,57
Ile	1	0,59	0,63	0,57
Leu	2	2,00	2,00	2,00
Tyr	2	1,68	1,44	1,73

Kette Nr. 12

	t	u	g
Asp	2	1,90	1,82
Glu	4	3,55	3,75
Gly	2	1,62	1,76
Ala	4	3,60	3,68
Val	2	1,44	1,54
Ile	1	0,51	0,72
Leu	2	2,00	2,00
Tyr	2	1,68	1,76

Kette Nr. 13

	t	u
Asp	2	1,92
Glu	4	3,58
Gly	2	1,62
Ala	3	2,72
Val	2	1,49
Ile	1	0,52
Leu	2	2,00
Tyr	2	1,82

Kette Nr. 14

	t	u
Asp	2	1,92
Glu	4	3,63
Gly	2	1,65
Ala	2	1,86
Val	2	1,54
Ile	1	0,62
Leu	2	2,00
Tyr	2	1,70

natürliche Rinder-A-Kette

	t	g
Asp	2	1,88
Ser	2	1,70
Glu	4	3,92
Gly	1	0,98
Ala	1	0,74
Val	2	1,43
Ile	1	0,92
Leu	2	2,00
Tyr	2	1,88

natürliche Rinder-B-Kette

	t	g
Asp	1	0,95
Thr	1	0,92
Ser	1	0,90
Glu	3	3,00
Pro	1	1,25
Gly	3	2,98
Ala	2	1,96
Val	3	2,86
Leu	4	4,18
Tyr	2	1,89
Phe	3	2,91
Lys	1	0,88
His	2	1,57
Arg	1	0,88

4. Diskussion

4.1. Syntheseverlauf und Kettenreinigung

Die analytische Verfolgung des Syntheseverlaufs ergibt einige interessante Aspekte:
Die Umsatzrate war schon bei der Ankupplung der ersten Aminosäure nicht vollständig (98,2%). Ein höherer Umsatz als 98,5% konnte überhaupt nicht erzielt werden. Die Wiederholung der Kupplung[50] brachte keine große Verbesserung; die Umsatzrate konnte damit nur um 0,6 - 1,5% erhöht werden. Auch durch Acetylieren mit extrem hohen Konzentrationen an Eisessig und DCCI ließen sich die unumgesetzten Aminogruppen nicht vollständig abblockieren.

Dies bedeutet, daß bei jedem Reaktionsschritt ein Teil der Aminogruppen nicht umgesetzt wird, und so bei jeder Kupplung Fehlsequenzen entstehen.
Die Kupplungsrate war mit p-Nitrophenylestern niedriger; dies bestätigt schon vorliegende Ergebnisse[50,59,60], daß die Kupplung mit DCCI schneller und vollständiger verläuft.
Erstaunlich ist, daß mit zunehmender Kettenlänge kaum ein Abfallen der Umsatzrate zu verzeichnen ist. Dagegen sank die Zahl der Gesamtaminogruppen im Lauf der Synthese auf fast die Hälfte des ursprünglichen Wertes ab. Dieses Phänomen wurde auch von BAYER und Mitarbeitern bei der Synthese des Ferredoxins[13] beobachtet. Der besonders starke Abfall nach Acetylierungsschritten wird darauf zurückzuführen sein, daß unter den dabei herrschenden Bedingungen zum Teil die Boc-Schutzgruppe abgespalten wird und die so entstandenen freien Aminogruppen irreversibel blockiert werden. Das Zurückgehen der Gesamtaminogruppen nach Gln^5 ist der Bildung von Pyroglutaminsäure zuzuschreiben[61]. Das stetige Absinken über die ganze Synthese hin könnte auf folgende drei Arten erklärt werden: a) Der Boc-Rest läßt sich aus sterischen Gründen mit zunehmender Kettenlänge schlechter abspalten; dadurch konnte auch das Gleichbleiben der Um-

satzrate verständlich werden. b) Es entstehen in zunehmendem Maße Kettenstumpfe, deren Aminoenden durch Nebenreaktionen blockiert sind. c) Bei jeder HCl/Eisessig-Behandlung wird ein kleiner Teil des Peptids vom Harz abgespalten[62].

Daß eine große Zahl von Kettenstümpfen entstanden sein muß, ergibt sich auch aus der Tatsache, daß die aus der Differenz der Gesamtaminogruppen auf dem Harz vor und nach der Abspaltung mit HBr/TFA errechnete Proteinausbeute wesentlich geringer ist (37%) als die tatsächlich erhaltene (44%). Für die Entstehung vieler Kettenstümpfe sprechen auch die Werte der Aminosäureanalysen: je weiter eine Aminosäure vom Carboxylende entfernt ist, desto geringer ist sie in der Analyse vertreten.

Als Verunreinigungen für die nach der MERRIFIELD-Methode hergestellten Ketten kommen also in erster Linie Kettenstümpfe und Ketten mit Fehlsequenzen in Frage. Weitere Verunreinigungen entstehen bei der Abspaltung der Schutzgruppen: Ketten, deren OH-, COOH- und SH-Schutzgruppen nur teilweise abgespalten, und Ketten, die durch Nebenreaktionen wie Desamidierung, Desulfurierung und Spaltung von Peptidbindungen chemisch verändert sind. Diese Verunreinigungen stellen zum größten Teil inaktiven Ballast dar (s. unter 4.3.) und müssen zur Erzielung höherer biologischer Aktivitäten unbedingt entfernt werden. Als bisher beste Methode erwies sich dafür die Ionenaustauschchromatographie auf der Stufe der S-Sulfonatkette[53,54]. Entfernt werden können damit alle Nebenprodukte, die im Sauren eine andere Ladung als die gewünschte Kette besitzen, also alle Kettenstümpfe bis zum Cys^7, Kettenstümpfe mit Pyroglutaminsäure in Stellung 5, Nebenprodukte und Fehlsequenzen mit weniger als vier S-Sulfonatgruppen. Nicht entfernt werden können mit dieser Methode alle anderen Fehlsequenzen, Kettenstümpfe, die erst nach Cys^6 enden, Ketten mit noch geschutzten OH- und COOH-Gruppen und Desamidoketten.

Die Ausbeute nach der Reinigung lag bei ca. 30%. Die Aktivität der Hybridinsuline stieg dadurch auf den 2-4fachen

Wert. Es ist deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die Verunreinigungen die Wirkung der Hybridinsuline nicht inhibieren.
Der Vergleich der Aktivität des Hybridinsulins einer natürlichen A-Kette mit derjenigen einer synthetischen A-Kette ergibt, daß das synthetische Produkt aufgrund seiner etwa funfmal geringeren Aktivität nur zum fünften Teil aus reiner Kette bestehen kann. Es kann demnach erst gelingen, Hybridinsuline mit 100% Aktivität zu isolieren, wenn die Synthesebedingungen so weit verbessert werden können, daß Fehlsequenzen vermieden werden, und wenn noch effektivere Reinigungsschritte gefunden werden können.

4.2. Vergleich der Synthesebedingungen.

Für die Kupplungsreaktion bei der MERRIFIELD-Synthese gilt das Massenwirkungsgesetz; dementsprechend muß die Kupplung umso vollständiger verlaufen, je höher die Konzentration der Aminosäure als löslichem Reaktionspartner an den reaktiven Stellen im Harz ist. Nebenreaktionen wie Aminosäureeinschiebungen, die bei hohen Konzentrationen denkbar sind, fallen nach neueren Untersuchungen[64] kaum ins Gewicht. Während bei Kette Nr.1 die Aminosäurekonzentration 0,15 Mol/l betrug, wurde sie bei Kette Nr.2 und 3 auf 0,4 Mol/l erhöht. Die Aktivität der Hybridinsuline mit gereinigter Kette stieg dabei auf das 3-4fache an, ein Zeichen dafür, daß die Kupplungsraten verbessert werden konnten. Eine weitere Erhöhung der Konzentration einiger Aminosäuren bis zu 1,0 Mol/l (Kette Nr.4) brachte keine weitere Verbesserung.
Um die Aminosäurekonzentrationen leichter erhöhen zu können, mußte auch die Beladung des Harzes erhöht werden. Eine Erhöhung der Beladung auf 0,5 bis 0,65 mMol/g machte sich nicht nachteilig bemerkbar. Anscheinend ist bei diesen Beladungsdichten noch mit keiner sterischen Hinderung im Harz zu rechnen.
Die Länge der Reaktionsdauer mit DCCI spielt keine große

Rolle und kann ohne weiteres auf 1,5 Std. gesenkt werden. Nach l.c.[62] ist die Reaktion ohnehin schon wesentlich früher beendet.

Zur Synthese der A-Ketten wurden drei verschiedene Schwefelschutzgruppen verwendet: Der herkömmliche S-Benzyl-Rest[52], Die S-Äthylmercapto-[65,29,5] und die S-Benzylmercapto-Schutzgruppe[40]. Ein Vergleich der Hybridinsuline zeigt, daß alle drei Schutzgruppen annähernd die gleichen Aktivitäten liefern. Der Arbeitsaufwand ist ebenfalls bei allen etwa gleich: Während sich S-Benzyl-Cystein leicht herstellen läßt, ist die Synthese der Disulfid-geschützten Cysteine recht aufwendig. Dagegen lassen sich der S-Äthylmercapto- und der S-Benzylmercapto-Rest vom fertigen Peptid sehr einfach durch Sulfitolyse abspalten, während beim S-Benzyl-Rest dazu die Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak notwendig ist. Interessant ist auch ein Vergleich der Ausbeuten: Die S-Benzyl-geschützten Ketten ließen sich mit Ausbeuten von 50-60% vom Harz abspalten, die Ketten mit den Disulfidschutzgruppen gingen dagegen nur zu etwa 30% vom Harz. Bei der Abspaltung des S-Benzylrestes bekam man Ausbeuten von etwa 40%, die Abspaltung der Disulfidschutzgruppen dagegen erbrachte 60-70% S-Sulfonat-Kette. Die Reinigung ergab bei beiden Schutzgruppentypen gleiche Ausbeuten, so daß am Ende auch die Over-all-Ausbeuten annähernd gleich waren.

Die A-Kette läßt sich trotz ihres niedrigeren Molekulargewichts in wesentlich schlechteren Ausbeuten vom Harz abspalten als die B-Kette[69]. Um zu klären, ob dies daran liegt, daß ein Teil der Esterbindungen aus sterischen Gründen bei der Abspaltung nicht erreicht wurde, wurde ein modifiziertes Harz hergestellt. Einem Vorschlag von MERRIFIELD folgend[66], wurde aus Acetoxymethylharz durch Behandlung mit HBr/TFA ein Brommethylharz hergestellt. Die reaktiven Gruppen dieses Harzes können nur an gut zugänglichen Stellen liegen. Mit einem aus diesem Brommethylharz hergestellten Boc-Asn-Harz wurde eine Ala^{12} Schaf-A-kette (Kette Nr.5) synthetisiert. Die Ausbeute nach der Abspaltung war aber nicht größer als bei der Vergleichs-

kette mit gewöhnlichem Harz (Kette Nr.4); die schlechten Ausbeuten können also nicht auf der Unzugänglichkeit der Esterbindung beruhen. Eine andere Erklärung wäre in Nebenreaktionen der Kette mit dem Harz zu suchen, zum Beispiel mit nicht veresterten Chlormethylgruppen. Damit könnte auch die jeweils nach der Kupplung von Cys^{A20} auftretende starke Braunfärbung des Harzes erklärt werden. Diese ist bei S-Benzyl-Ketten wesentlich schwächer als bei Ketten mit Disulfidschutzgruppen, die in Übereinstimmung damit auch in geringerer Ausbeute zu erhalten sind. Hängt bei abgewandelten A-Ketten Alanin statt Asparagin als erste Aminosäure auf dem Harz[44], so ist die Ausbeute besser und in Analogie dazu die Braunfärbung schwächer.

4.3. Variation der Kettenlänge

Die Frage, ob die Insulinketten in ihrer gesamten Länge zur Wirkung notwendig sind, wurde zuerst durch enzymatischen Abbau des Gesamtinsulinmoleküls untersucht. Dabei zeigte sich, daß von der B-Kette ohne Aktivitätsverlust die ersten sechs Aminosäuren mit Leucinaminopeptidase abgespalten werden können[67]. Das durch Verdauung mit Carboxypeptidase erhaltene $Des\text{-}Ala^{B30}$-Insulin[68] war ebenfalls voll aktiv. Diese Befunde konnten an sythetischen B-Ketten bestätigt und erweitert werden[69,70]. Bei der A-Kette hingegen führte die Abspaltung des carboxylendständigen Asparagins mit Carboxypeptidase sofort zum Aktivitätsverlust[17,18]. Auch das Glycin am Aminoende ist für die Wirkung des Hormons unbedingt notwendig[1]. Ebenfalls unwirksam war ein $Des\text{-}Ile^{A2}$-Hybridinsulin[2]; hier kann der Aktivitätsverlust auch bei dem fehlenden Ile liegen, das ebenfalls essentiell ist[4]. Zur Klärung der Frage, ob nicht wenigstens eine Aminosäure in der Mitte der Kette weggelassen werden kann, wurde deshalb eine $Des\text{-}Ser^{12}$-Schaf-A-Kette (Kette Nr.6) hergestellt, da das Serin ohne weiteres austauschbar ist[1]. Die Aktivität des Hybridinsulins betrug nur noch $0{,}71 \pm 0{,}36\%$; eine unter den selben Bedingungen hergestellte $[Ala^{12}]$-Schaf-A-Kette erbrachte dagegen eine

Aktivität von 8,0%. Die Wirkung ist also durch die Verkürzung bis auf einen geringen Rest verloren gegangen; das bedeutet, daß die A-Kette unbedingt in ihrer ganzen Länge vorliegen muß, damit das Insulin voll aktiv ist. Für die MERRIFIELD-Synthese der A-Kette ist dieses Ergebnis insofern von Bedeutung, als es mit hoher Wahrscheinlichkeit zeigt, daß alle Fehlsequenzen und Stümpfe, die im Laufe der Synthese entstehen, inaktives Material sind, und man nur zu 100% aktiven Hybridinsulinen kommen kann, wenn es gelingt, Fehlsequenzen zu vermeiden oder sie durch Reinigung vollkommen zu entfernen.

FRAENKEL-CONRAT stellte durch schonende Acetylierung der Aminogruppen des Insulins mit Acetanhydrid ein Triacetylinsulin dar, dessen biologische Aktivität über 75% lag[19]. Er schloß daraus, daß die drei Aminogruppen für die Wirkung des Hormons überflüssig seien. Dieses Ergebnis konnte auch mit einer synthetischen N-Acetyl- [Ala^{12}]-Schaf-A-Kette (Kette Nr.7) bestätigt werden. Die Aktivität des Hybridinsulins betrug 10,3 $\pm$ 1,2% bezogen auf Rinderinsulin, während die unter den gleichen Bedingungen hergestellte [Ala^{12}] Schaf-A-Kette eine Aktivität von 12,3 $\pm$ 2,2% erbrachte. Die A-Kette kann also ohne Aktivitätsverlust am Aminoende um den Acetylrest verlängert werden.

4.4. Variationen im intrachenaren Ring

Vergleicht man die A-Ketten verschiedener Tierspezies, so weisen die Aminosäuren der Positionen Nr. 8-10 große Unterschiede auf:

	8	9	10
Schaf:	Ala	Gly	Val
Rind:	Ala	Ser	Val
Meerschweinchen:	Ala	Gly	Thr
Elefant:	Thr	Gly	Val
Pferd:	Thr	Gly	Ile
Mensch, Schwein:	Thr	Ser	Ile
See-Wal:	Ala	Ser	Thr
Huhn:	His	Asn	Thr

Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß diesen Aminosäu-

ren fur die Wirkung keine spezifische Bedeutung zukommt. In einer fruheren Arbeit über die Funktion der hydrophoben aliphatischen Aminosäuren[1)] konnte gezeigt werden, daß in Stellung 10 ohne Aktivitätsverlust auch Leucin eingeführt werden kann. Das Hybridinsulin mit einem Alanin an dieser Stelle (Kette Nr.8) war ebenfalls noch aktiv (8,9 ± 3,4%); das unter den selben Bedingungen hergestellte Hybridinsulin mit einer [Ala^{12}]-Schaf-A-Kette hatte eine Aktivität von 12,3 ± 2,2%. Wurde dagegen auch in Stellung 9 ein Alaninrest eingeführt, so sank die Aktivität auf die Hälfte ab: Das [Ala^{9}, Ala^{12}]-Hybridinsulin (Kette Nr.9) hatte nur noch 5,2 ± 0,9% und das Hybridinsulin mit einer [Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{12}] Schaf-A-Kette 5,2 ± 2,9% (Kette Nr.10). Diese Ergebnisse überraschen, da Alanin von seiner Struktur her gesehen Serin und Glycin recht ähnlich ist und diese beiden die volle Aktivität bringen. Eine sterische Hinderung bei der Rekombination kann auch nicht in Frage kommen. Im Insulinmodell von HODGKIN[71)] liegen die drei Aminosäurereste an der Oberfläche des Moleküls und scheinen keine Bedeutung für die Konformation des Insulins zu haben. Als Erklärung wäre denkbar, daß für die volle hypoglykämische Wirkung an Position 9 eine hydrophile Gruppe notwendig ist. Dieser Forderung wurden Serin mit seiner OH-Gruppe und das Asparagin des Huhnes mit seiner Säureamidgruppe genügen; da Glycin keine Seitenkette hat, liegen bei ihm seine beiden hydrophilen Peptidbindungen frei. Beim Alanin dagegen verdeckt die Methylseitenkette die Peptidgruppierung.

Das Huhn unterscheidet sich erheblich von den anderen Spezies, da es Histidin und Asparagin im intrachenaren Ring hat. Da das Hühnerinsulin in verschiedenen Testsystemen eine erhöhte Aktivität zeigt[72)], erhebt sich die Frage, ob dieser Effekt darauf zurückzuführen ist. Das Hybridinsulin mit einer synthetischen [Ala^{12}] Hühner-A-Kette (Kette Nr.11) hatte eine Aktivität von 10,1 ± 3,7%. Das unter den gleichen Bedingungen hergestellte Hybridinsulin einer [Ala^{12}] Schaf-A-Kette hatte 12,3 ± 3,7%; dieses Ergebnis läßt nicht den Schluß zu, daß die Gruppierung His-Asn für die erhöhte Aktivität des Hühnerinsulins

nicht verantwortlich sei. Denn die erhaltenen Aktivitätswerte entstammen dem Mäusefalltest, in welchem auch natürliches Hühnerinsulin kaum eine erhöhte Aktivität zeigt [72].

4.5. Bedeutung der intrachenaren Disulfidbrücke

Über die Funktion der intrachenaren Disulfidbrücke ist noch nicht viel bekannt. Ihre selektive Reduktion ist bisher noch nicht gelungen, doch verliert das Hormon bereits seine hypoglykämische Wirksamkeit bei statistischer Reduktion von einem Drittel seiner drei Disulfidbindungen[73]. Auf Grund der Synthese eines Hybridinsulins, in dem das Cystin (6A - 11A) durch den isosteren Cystathionin-Rest ersetzt war, kamen ZAHN und RUDINGER[20] zu der Ansicht, daß eine Reaktion der intrachenaren Disulfidbrücke als obligatorischer Schritt für den Wirkungsmechanismus des Insulins auszuschließen ist. Nach dem Modell von HODGKIN[71] liegt die Disulfidbrücke ganz im Inneren des Insulinmoleküls eingeschlossen; sie dürfte also weniger für den Wirkungsmechanismus als für die Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation von Bedeutung sein. In Übereinstimmung damit könnte der Befund stehen, daß ein Hybridinsulin, dessen zwei Cysteine in Stellung 6 und 11 der A-Kette durch Alaninreste ersetzt sind[3] (Kette Nr.12), nur noch geringe Restaktivität zeigt. Da dieses Hybridinsulin nicht in reiner Form isoliert werden konnte, kann nicht geklärt werden, ob die Aktivität nur deshalb abfällt, weil die Rekombination mit der B-Kette wegen der Länge des nun gestreckt vorliegenden A-Ketten-Moleküls behindert ist.
Es wurden deshalb zwei A-Ketten synthetisiert, bei denen die beiden Cysteine wieder durch Alanin ersetzt und in deren Kettenmitte eine bzw. zwei Aminosäuren ausgelassen wurden (Kette Nr. 13 und 14). Durch diese Verkürzung wurde die A-Kette wieder ungefähr auf die Länge einer normalen A-Kette mit intrachenarem Ring gebracht, so daß die Rekombination mit der B-Kette nicht mehr behindert sein dürfte. Die beiden Hybridinsuline besaßen je-

doch praktisch kaum eine Aktivität. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, daß die intrachenare Disulfidbrücke eine unentbehrliche Funktion bei der Erhaltung der Konformation des Insulinmoleküls ausübt.

5. Zusammenfassung

Die MERRIFIELD-Synthese einer Rinder-Insulin-A-Kette wurde analytisch verfolgt. Es wurde festgestellt, daß keine Aminosäure vollständig kuppelt, und daß doppeltes Reagieren und Acetylieren kaum eine Verbesserung des Umsatzes bringen. Während die Kupplungsrate annähernd gleich bleibt, fällt die Zahl der freien Aminogruppen im Laufe der Synthese ab.
Anhand der Synthese einiger [Ala^{12}]Schaf-A-Ketten wurden die Synthesebedingungen weiter untersucht: Die Kupplungsrate ist konzentrationsabhängig. Die S-Äthylmercapto- und die S-Benzylmercapto-Schutzgruppe sind der S-Benzyl-Schutzgruppe gleichwertig.
Die durch Ionenaustauschchromatographie gereinigten synthetischen A-Ketten ergaben nach der Kombination mit natürlicher B-Kette ungefähr 10% Aktivität, bezogen auf Rinderinsulin, Kombination mit einer natürlichen A-Kette erbringt etwa 60%. Die synthetischen Ketten sind deshalb noch stark verunreinigt; eine Reindarstellung der Hybridinsuline ist noch nicht lohnend.
Als Beitrag zum Problem "Struktur und Wirkung von Insulin" wurden folgende abgewandelten A-Ketten synthetisiert:
Des-Ser^{12}-Schaf-A-Kette, N-Acetyl-[Ala^{12}]Schaf-A-Kette,
[Ala^{9}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette, [Ala^{10}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette,
[Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette, [Ala^{12}]Hühner-A-Kette,
[Ala^{6}, Ala^{11}, Ala^{12}]Schaf-A-Kette,
Des-Ser^{12}-[Ala^{6}, Ala^{11}]Schaf-A-Kette,
Des-Cys^{11}-, des-Ser^{12}-[Ala^{6}]Schaf-A-Kette.
Diese Ketten wurden mit natürlicher B-Kette rekombiniert und die Aktivität bestimmt. Anhand der Ergebnisse wurde die Bedeutung der Kettenlänge, die Funktion der intrachenaren Disulfidbrücke und die Bedeutung der Aminosäuresequenz im intrachenaren Ring diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1) U.WEBER,F.SCHNEIDER,P.KÖHLER u. G.WEITZEL,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 348,947 (1967)

2) U.WEBER,S.HÖRNLE,G.GRIESER,K.-H.HERZOG u. G.WEITZEL,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 348,1715 (1967)

3) U.WEBER,S.HÖRNLE,P.KÖHLER,G.NAGELSCHNEIDER,
K.EISELE u. G.WEITZEL,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 349,512 (1968)

4) S.HÖRNLE,U.WEBER u. G.WEITZEL,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 349,1428 (1968)

5) U.WEBER,K.-H.HERZOG,H.GROSSMANN,S.HÖRNLE u. G.WEITZEL,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 350,1425 (1969)

6) R.B.MERRIFIELD,
J.Amer.chem.Soc. 85,2149 (1963)

7) R.B.MERRIFIELD,
Biochemistry 3, 1385 (1965)

8) G.R.MARSHALL u. R.B.MERRIFIELD,
Biochemistry 4, 2394 (1965)

9) J.M.STEWART u. J.D.YOUNG,
"Solid Phase Peptide Syntheses",
W.H.Freeman and Company, San Francisco 1969

10) R.B.MERRIFIELD,
"Solid Phase Peptide Synthesis",
in Advances in Enzymology Vol.32,
Interscience Publishers, New York 1969, p. 221 ff.

11) A.MARGLIN u. R.B.MERRIFIELD,
J.Amer.chem.Soc. 88,5051 (1966)

12) H.ZAHN,T.OKUDA u. Y.SHIMONISHI,
Angew.Chem. 79, 424 (1967)

13) E.BAYER,H.HAGENMAIER,G.JUNG u. W.A.KÖNIG
in "Peptides 1968",
E.BRICAS,Ed.,North-Holland Publishing Co.,
Amsterdam 1968, p.162

14) E.BAYER,H.ECKSTEIN,K.HÄGELE,W.A.KÖNIG,
W.BRÜNING,H.HAGENMAIER u. W.PARR,
J.Amer.chem.Soc. 92, 1735 (1970)

15) H.GROSSMANN,
Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1968

16) W.F.BENISEK,M.A.RAFTERY u. R.D.COLE,
Biochemistry 6, 3780 (1967)
17) D.S.H.W.NICOL,
Biochem.J. 75, 395 (1960)
18) L.I.SLOBIN u. F.H.CARPENTER,
Biochemistry 2, 16 (1963)
19) J.FRAENKEL-CONRAT u. H.FRAENKEL-CONRAT,
Biochim.biophysica Acta 5, 89 (1950)
20) K.KOST,J.RUDINGER,H.KLOSTERMEYER u. H.ZAHN,
Z.Naturforsch. 23b, 1059 (1968)
21) G.PATAKI,
"Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie",
Walter de Gruyter, Berlin 1966, p.108
22) G.JANDER,K.F.JAHR u. H.KNOLL,
"Maßanalyse",
Walter de Gruyter, Berlin 1963, p.286 ff
23) Y.-C.DU,Y.-S.ZHANG,Z.-X.LU u. C.-L.TSOU,
Scientia Sinica 10, 84 (1961)
24) Y.-C.DU, R.-Q.JIANG u. C.-L.TSOU,
Scienta Sinica 14, 229 (1965)
25) L.A.CARPINO,C.A.GIZA u. B.A.CARPINO,
J.Amer.chem.Soc.81, 955 (1959)
26) G.BRAUN
in "Organic Synthesis" Vol.13,
John Wiley and Sons, New York 1933, p.86
27) L.D.SMALL, J.H.BAILEY u. C.J.CAVALLITO,
J.Amer.chem.Soc.69, 1710 (1947)
28) S.YURUGI,
J.pharmac.Soc.Japan 74, 513 (1954)
29) U.WEBER,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 350, 1421 (1969)
30) M.FRAENKEL,D.GERTNER,H.JACOBSEN u. A.ZILLKA,
J.chem.Soc.[London]C1960, 1390
31) S.GUTTMANN u. R.A.BOISSONNAS,
Helv.chim.Acta 41, 1864 (1958)
32) J.L.WOOD u. V.DU VIGNEAUD,
J.biol.Chemistry 134, 413 (1940)

33) W.GRASSMANN,E.WÜNSCH,P.DEUFEL u. A.ZWICK,
Chem.Ber. 91, 538 (1958)
34) K.OKAWA,
Bull.chem.Soc.Japan, 29, 486 (1956) u. 30, 110 (1957)
35) J.P.GREENSTEIN u. M.WINITZ,
"Chemistry of the Amino Acids",Vol.III,
John Wiley u. Sons, New York 1961, p.2231-2233
36) U.J.HRUBY u. K.E.EHLER,
J.org.Chemistry 35, 1690 (1970)
37) E.WÜNSCH, G.FRIES u. A.ZWICK,
Chem.Ber. 91, 542 (1958)
38) E.SCHNABEL,
Liebigs Ann.Chem.702, 188 (1967)
39) E.SCHNABEL,H.HERZOG,P.HOFFMANN,E.KLAUKE u. I.UGI,
Liebigs Ann.Chem.716, 175 (1968)
40) U.WEBER u. P.HARTTER,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem., im Druck
41) E.SCHRÖDER u. E.KLIEGER,
Liebigs Ann.Chem. 673, 208 (1964)
42) H.ZAHN,W.DANHO u. B.GUTTE,
Z.Naturforsch. 21b, 763 (1966)
43) E.SANDRIN u. R.A.BOISSONNAS,
Helv.chim.Acta 46, 1637 (1963)
44) K.-H.HERZOG,
naturwiss.Dissertation, Universität Tübingen, 1970
45) K.W.PEPPER,H.M.PAISLEY u. M.A.YOUNG,
J.chem.Soc.[London]C 1953, 4097
46) l.c.[9)], p.32
47) l.c.[9)], p.27
48) J.HALSTRØM u. H.KLOSTERMEYER,
Liebigs Ann.Chem. 715, 208 (1968)
49) Th.WIELAND,C.BIRR u. F.FLOR,
Liebigs Ann.Chem. 727, 130 (1969)
50) F.WEYGAND u. R.OBERMEIER,
Z.Naturforsch. 23b, 1390 (1968)
51) L.C.DORMAN,
Tetrahedron Letters [London] 1969, 2319
52) R.H.SIFFERD u. V.DU VIGNEAUD,
J.biol.Chemistry 108, 753 (1935)
53) Y.SHIMONISHI u. H.ZAHN,
Biochim.biophysica Acta 154, 598 (1968)

54) Y.SHIMONISHI, H.ZAHN u. W.PULS,
Z.Naturforsch. 24b, 422 (1969)
55) P.G.KATSOYANNIS u. A.TOMETSKO,
Proc.nat.Acad.Sci.USA 55, 1554 (1966)
56) D.M.YOUNG u. A.H.LEWIS,
Science [New York] 105, 368 (1947)
57) T.B.GRIFFIN, F.W.WAGNER u. J.M.PRESCOTT,
J.Chromatogr. [Amsterdam] 23, 280 (1966)
58) C.-I.NIU, Y.-T.KUNG,W.-T.HUANG,L.-T.KE,C.-C.CHEN,
Y.-C.DU,R.-Q.JIANG,C.-L.TSOU,S.-C.HU,S.-Q.CHU u. K.-Z.
WANG,
Scientia Sinica 15, 231 (1966)
59) H.KLOSTERMEYER,
Chem.Ber. 101, 2823 (1968)
60) S.KARLSSON,G.LINDEBERG u. W.RAGNARSSON,
Acta chem.scand. 24, 337 (1970)
61) H.TAKASHIMA, R.B.MERRIFIELD u. V.DU VIGNEAUD,
J.Amer.chem.Soc. 90, 1323 (1968)
62) W.GEISING,
naturwiss. Dissertation, Universität Tübingen, 1970
63) l.c.[10], p.264
64) A.R.MITCHELL u.R.W.ROESKE,
J.org.Chemistry 35, 1171 (1970)
65) N.INUKAI,K.NAKANO u. M.MURAKAMI,
Bull.chem.Soc.Japan 40, 2913 (1967) und 41, 182 (1968)
66) l.c.[10], p.238
67) E.L.SMITH,R.L.HILL u. A.BORMAN,
Biochim.biophysica Acta 29, 207 (1958)
68) M.BODANSKY u. J.FRIED,
Chem.Abstr.62, 12988b (1965)
69) K.EISELE,
naturwiss. Dissertation, Universität Tübingen, 1970
70) G.WEITZEL,K.EISELE,H.ZOLLNER u. U.WEBER,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 350, 1480 (1969)
71) D.C.HODGKIN et.al.,
Nature [London] 224, 491 (1969)
72) W.KEMMLER u. R.RAGER,
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 349, 515 (1968)
73) O.WINTERSTEINER,
J.biol.Chemistry 102, 473 (1933)

Lebenslauf

Am 19. Juli 1943 wurde ich als Sohn des Bauingenieurs Hugo Großmann und seiner Frau Gertrud, geb. Bolay, in Heilbronn/N. geboren. Dort besuchte ich von 1949 bis 1953 die Volksschule und anschließend in Tübingen das humanistische Uhland-Gymnasium, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte. Danach begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Biochemie, das ich im Frühjahr 1968 mit der Diplom-Hauptprüfung abschloß.

Von Juli 1968 bis Juli 1970 arbeitete ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität unter Anleitung von Professor Dr.Dr. G.Weitzel an der vorliegenden Dissertation: "Merrifield-Synthesen variierter Insulin-A-Ketten".

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren:

Physiologische Chemie:	F.Schneider, G.Weitzel
Anorganische Chemie:	W.Rüdorff
Organische Chemie:	E.Bayer, E.Müller
Physikalische Chemie:	H.Mauser
Physik:	H.Krüger
Anatomie:	K.Mörike
Botanik:	E.Bünning, H.Metzner
Zoologie:	K.G.Grell
Mikrobiologie:	F.Lingens, H.Zähner
Pharmakologie:	H.Remmer.

Bönecke-Druck - Clausthal-Zellerfeld, Postfach 29